

Aus der II. Medizinischen Klinik
der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. E. Buchborn

**RENALE PROSTAGLANDIN E (PGE) SYNTHESE:
Radioimmunologische und biologische PGE-Analyse
im Kaninchen — und Humanurin und Änderung
der PGE-Ausscheidung nach Uninephrektomie***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Wolfgang Siess
aus Tübingen
1976

1977

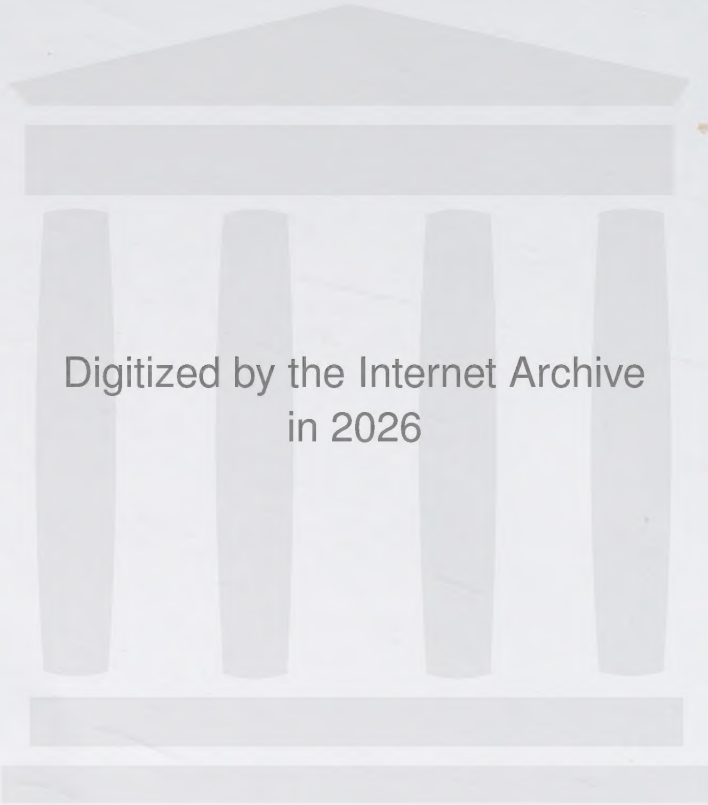
*Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft, We 681/2

Am 25. April 1914

Sehr geehrte Herr

Ich habe die Ehre Ihnen zu schreiben, dass ich die

Für Bine



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der II. Medizinischen Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. E. Buchborn

RENALE PROSTAGLANDIN E (PGE) SYNTHESE:

Radioimmunologische und biologische PGE-Analyse im
Kaninchen- und Humanurin und Änderung der PGE-Ausscheidung
nach Uninephrektomie *

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Wolfgang Siess

aus
Tübingen

1976

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft,
We 681/2



Mit Genehmigung des Fachbereichs der Universität München

Berichterstatter: Priv.Doiz. Dr. E. Held

Mitberichterstatter: Professor Dr. E. Buchborn

Dekan: Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.4.1977

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
I Einleitung	4
II Stand der Forschung	5
A Chemie der Prostaglandine	5
B Biosynthese und Metabolismus der Prostaglandine; das renale Prostaglandinsystem	6
C Funktion der renalen Prostaglandine	12
D Anpassung der Nierenfunktion nach akuter Nierenparenchymreduktion	16
a) Modell der Uninephrektomie	16
b) Rolle der renalen Prostaglandine für die Funktionsanpassung der Restniere	19
E Quantitative Prostaglandin-Bestimmung	20
III PGE-Analyse im Kaninchen- und Humanurin	
A Methodik	24
a) Gewinnung der Urine	24
b) Aufbereitung der Urine	25
(α) Extraktion	25
(β) Chromatographische Trennung	27
1 Kieselgelsäulenchromatographie	27
2 Dünnschichtchromatographie	29
3 Säulenchromatographie an Sephadex LH-20	31
c) Quantitative Bestimmung von PGE	32
(α) Biologische PGE-Analyse	32
(β) Radioimmunologische PGE-Analyse	37
1 Methode und Materialien	37
2 Radioimmunologische Bestimmung von PGE im Kaninchenurin	39
3 Radioimmunologische Bestimmung von PGE im Humanurin	40

	Seite
4 Vergleich verschiedener Konversionsmethoden von PGE ₂ zu PGB ₂	43
(γ) Vergleich von Radioimmunoassay und Bioassay	48
B Ergebnisse der PGE-Analyse im Urin	50
a) Extraktion und chromatographische Trennung	50
b) Biologische PGE-Analyse	50
c) Radioimmunologische PGE-Analyse	52
C Diskussion zur PGE-Analyse im Urin	53
 IV Uninephrektomie an Kaninchen:	
PGE- und Elektrolytausscheidung und Urinvolumen der verbleibenden Niere	
A Methodik der Uninephrektomieversuche	63
a) Chronische Versuche	63
b) Akut-Versuche	64
c) Auswertung	65
B Ergebnisse der Uninephrektomieversuche	68
a) Chronische Versuche	68
b) Akut-Versuche	74
C Diskussion zu den Uninephrektomieversuchen	79
 V Zusammenfassung	84
 VI Anhang: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse der Uninephrektomie-Versuche	86
 VII Literatur	103

A B K Ü R Z U N G E N

GFR	=	Glomeruläre Filtration
Lit	=	Literaturübersicht
PG	=	Prostaglandin
RBF	=	renaler Blutfluß
RIA	=	Radioimmunoassay
UV	=	Urinvolumen

I Einleitung

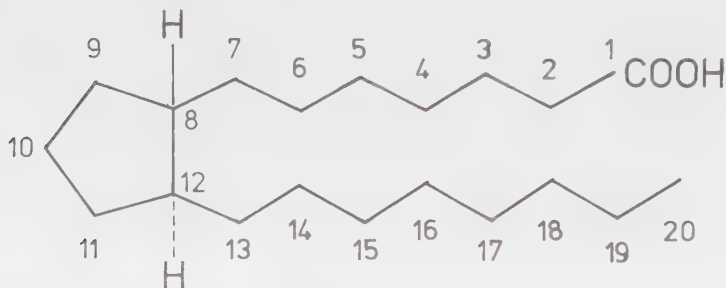
Anfang 1930 beschrieben von Euler und Goldblatt unabhängig voneinander blutdrucksenkende, die glatte Muskulatur stimulierende Substanzen in der menschlichen Samenflüssigkeit (26, 33). Von Euler nannte sie Prostaglandine, in der Annahme, sie würden von der Prostata sezerniert. Diese Entdeckung blieb jedoch ohne weiteres wissenschaftliches Interesse. Erst 30 Jahre später, Anfang 1960, isolierten Bergström und Samuelsson einige dieser Substanzen und klärten ihre chemische Struktur auf (8, 92). Seitdem wurden Prostaglandine (PG:s) in fast allen Organen und Gewebsflüssigkeiten gefunden, wobei sich in den Samenbläschen des Schafes, im Nierenmark des Kaninchens und in der Lunge des Schweines die höchsten PG-Syntheseaktivitäten fanden (9, 17).

1965 isolierten Lee et al. drei PG-ähnliche, vasodilatatorische Substanzen aus dem Nierenmark von Kaninchen, von denen sie später zwei als PGE_2 bzw. $\text{PGF}_{2\alpha}$ und eine von ihnen 1965 neu entdeckte, als "Medullin" bezeichnete Substanz als PGA_2 identifizierten (61, 62). Weitere Arbeiten zeigten, daß das für die Niere bedeutendste und quantitativ wichtigste Prostaglandin PGE_2 ist, während PGA_2 artifiziell bei bestimmten Extraktionsmethoden in vitro entstehen kann (37, 20, 77). So gibt es bislang keinen biochemischen Anhalt für eine PGA -Biosynthese. Weiterhin konnte in letzter Zeit anhand spezifischer Bestimmungsmethoden PGA weder in der Niere noch im Plasma nachgewiesen werden (59, 31).

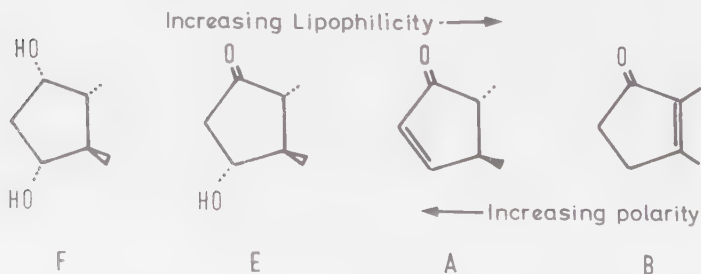
II. Stand der Forschung

A Chemie der Prostaglandine

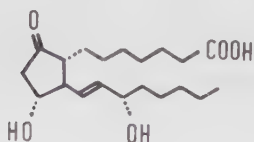
Prostaglandine (PG:s) sind ungesättigte, zyklische Fettsäuren, bestehend aus einem Gerüst aus 20 Kohlenstoffatomen, dessen chemische Grundstruktur die Prostanoidsäure darstellt:



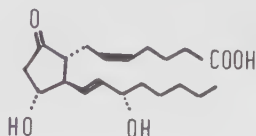
Entsprechend den funktionellen Gruppen und der Lage der Doppelbindungen am Zyklopentanring werden sie in folgende Gruppen eingeteilt:



Die Anzahl der Doppelbindungen in den Seitenketten, welche für die räumliche Struktur der PG wichtig sind, wird durch einen angefügten Zahlenindex angegeben; die Doppelbindungen liegen primär bei C_{13,14} ("PGE₁"), sekundär bei C_{5,6} ("PGE₂"):



PGE₁



PGE₂

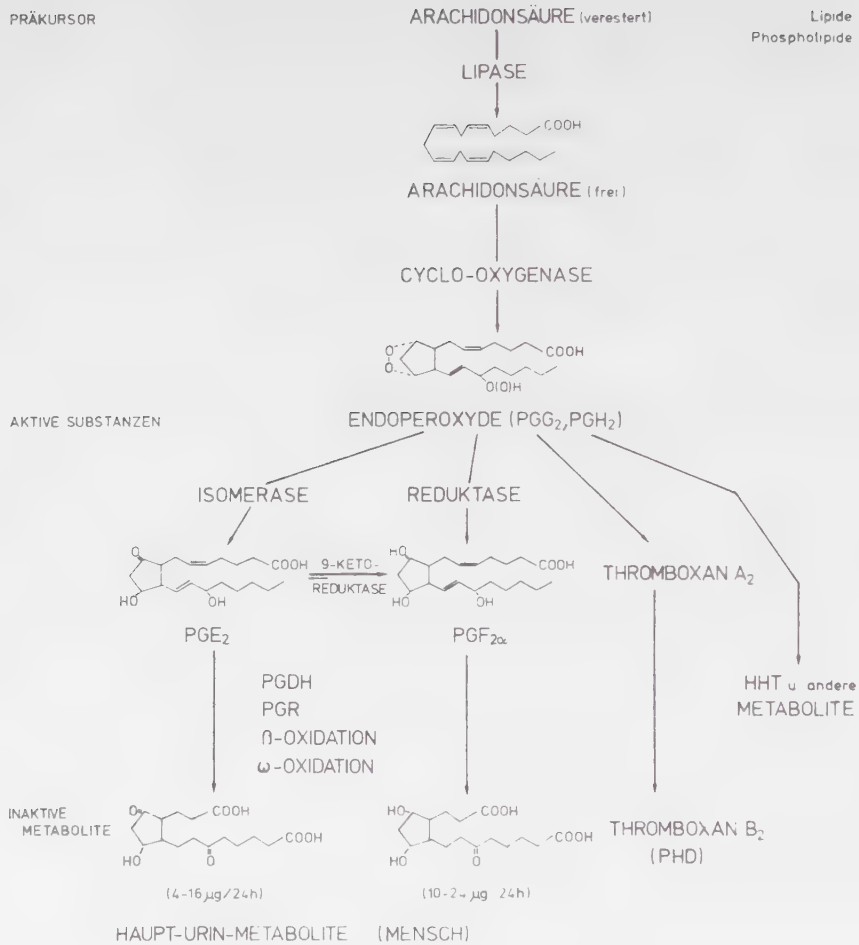
1) Biosynthese und Metabolismus der Prostaglandine; das renale Prostaglandinsystem (Abb. 1)

Dihomo- γ -linolensäure (8, 11, 14 - eicosatrienoic acid, C 20:3) und Arachidonsäure (5,8,11,14 - eicosatetraenoic acid, C 20:4), beides essentielle Fettsäuren, stellen die Präkursoren für die Biosynthese der Prostaglandine der E- bzw. F-Reihe dar, wobei aus Dihomo- γ -linolensäure die in der Seitenkette einfach ungesättigten PG's ("PGE₁"), aus Arachidonsäure die in der Seitenkette zweifach ungesättigten PG's ("PGE₂") entstehen (10, 21). Letztere spielen wegen des reichen Vorkommens von Arachidonsäure in Organen und Geweben quantitativ die Hauptrolle. Arachidonsäure, welche in der menschlichen Niere vorwiegend mit Phospholipiden und nur zu einem geringen Teil mit neutralen Lipiden verestert ist (23), wird durch eine Phospholipase A bzw. Lipase freigesetzt und ist damit für den membran- gebundenen PG-Synthetasekomplex (Cyclooxygenase, Endoperoxydisomerase, Peroxydase), der vor allem im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist (12), verfü-

PRÄKURSOR

Lipide
Phospholipide

AKTIVE SUBSTANZEN



bar (56, 118). Dieser synthetisiert Arachidonsäure über gemeinsame Endoperoxydformen (PGG_2 , PGH_2) zu PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, zu Thromboxanen oder zu HHT (12L-hydroxy-5,8,10 heptadecatrienoic acid; 39, 40). Die erst in jüngster Zeit erfolgte Entdeckung der Endoperoxyde, der Thromboxane und der HHT beruht auf Untersuchungen an Thrombozyten, in denen außer diesen PG-Synthetase-abhängigen Transformationsprodukten der Arachidonsäure auch ein von der PG-Synthetase unabhängiger Syntheseweg beschrieben wurde, der durch Einwirkung einer Lipoxygenase auf die Arachidonsäure zu dem nichtzyklischen Produkt HETE (hydroxy-eicosatetraenoic acid) führt (95). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der PG-Synthese scheint die lokale Verfügbarkeit der freien Arachidonsäure zu sein (93). Die synthetisierten PG's werden sofort freigesetzt, eine Lagerung in den synthetisierenden Zellen ist nicht bekannt.

Die Endoperoxyde zeichnen sich durch ihre viel größere biologische Aktivität gegenüber den klassischen PG's (bisher an der glatten Muskulatur der Lungengefäße und in Thrombozyten nachgewiesen) und ihre biologische wie chemische Instabilität aus (41). Ihnen spricht man einen großen Teil der biologischen Wirkungen der Prostaglandine zu. Inwieweit sie innerhalb der Niere eine Rolle spielen, ist bisher noch nicht geklärt, jedoch für die Reninfreisetzung neuerdings wahrscheinlich gemacht worden (121).

Die PG-Synthese in den hierzu befähigten Zellen, d. h. an physiologischen Stellen, kann auf zwei entgegengesetzte Weisen beeinflußt werden: die endogene PG-Bildung wird erhöht durch exogene Zufuhr von Arachidonsäure (precursor overload principle) oder vermindert bzw. blockiert durch nicht steroidale Antiphlogistika, besonders durch Indomethacin, Acetylsalizylsäure und Meclofenamat. Ihre Wirkung beruht auf einer Hemmung des

PG-Synthetasekomplexes mit Blockierung der Endoperoxyd-Bildung (116, 102, 28).

Für den Prostaglandinmetabolismus sind folgende Enzyme wichtig: die 15-OH-Prostaglandindehydrogenase (PGDH), die im Zytoplasma lokalisiert ist (3), dehydriert die PG's zu 15-keto-PG's, welche biologisch inaktiv sind. Anschließend hydriert die 13, 14-Prostaglandinreduktase (PGR) die 15-keto-PG's zu 15-keto-, 13, 14-dihydrierten PG's. Die Hauptmetabolite von PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ in Plasma und Urin haben diese 15-keto-13, 14-Dihydrostruktur, wobei die Urinmetabolite durch β - und ω -Oxydation noch weiter zu C_{16} -Dicarbonsäuren abgebaut werden (36, 38). Als weiteres metabolisierendes Enzym dürfte die neuerdings beschriebene PGE_2 -9-Ketoreduktase, die PGE_2 zu $\text{PGF}_{2\alpha}$ dihydriert, eine wesentliche Rolle spielen, da PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ oft gegensätzliche biologische Wirkungen haben (108).

Innerhalb der Niere ist das PG-System (PG-Synthese und PG-Abbau) regional quantitativ unterschiedlich verteilt: im Mark, besonders in der Papille dominiert die PG-Synthese. Die PG-Synthetaseaktivität sowie der PG-Gehalt im Gewebe sind hier sehr hoch; die PGDH-Aktivität, verantwortlich für die initiale PG-Inaktivierung, ist gering. Umgekehrte Verhältnisse finden sich in der Nierenrinde: hier dominiert der PG-Abbau; die PGDH-Aktivität ist sehr hoch. Eine PG-Synthese (gemessen an PG-Synthetaseaktivität und PG-Gehalt im Gewebe) wurde im Gegensatz zu früheren Untersuchungen zwar neuerdings nachgewiesen, sie betrug aber nur ca. 1/10 der Synthese im Mark (57, 104). Hierbei könnte es sich möglicherweise um eine zu niedrig angenommene PG-Syntheseaktivität handeln, da der Nachweis über die Entstehung von PGE_2 geführt wurde, wobei die Wirkung der PGE_2 -9-Ketoreduktase, die PGE_2 in $\text{PGF}_{2\alpha}$ überführt und deren Aktivität vorwiegend auf die Nierenrinde beschränkt ist (108, 53), nicht genügend berücksichtigt wurde.

Als Syntheseorte der im Nierenmark in großer Menge gebildeten PG's sind bisher die renomedullären Interstitialzellen und die Sammelrohrephthelien bekannt (81, 45). Für die dort synthetisierten und wegen der dort geringen Metabolisierung biologisch aktiven PG's gibt es theoretisch verschiedene Möglichkeiten eines "Abtransportes":

Einerseits könnten sie in das vaskuläre System, d. h. in die aufsteigenden vasa recta freigesetzt werden und würden auf diese Weise über die venae arcuatae unter Umgehung der kortikalen Inaktivierung in das Nierenvenenblut gelangen. Hierfür spricht die hohe PG-Konzentration im Nierenvenenblut; (die arterielle PG-Konzentration, < 20 pg/ml beim Menschen, ist sehr niedrig (73)). Die PG's könnten auf diesem Wege durch ihre biologische Wirksamkeit den Venolen- bzw. Venentonus innerhalb bzw. außerhalb der Niere beeinflussen und damit an der Regulation des renalen Blutflusses sowie u.U. des venösen Rückstroms zum rechten Herz mitbeteiligt sein (25).

Andererseits könnten die im Nierenmark synthetisierten PG's direkt in das tubuläre System, d. h. in die aufsteigende Henle'sche Schleife oder in die Sammelrohre freigesetzt werden und würden auf diese Weise im Urin erscheinen. Entsprechend wurden Prostaglandine (PGE_1 , PGE_2 , $\text{PGF}_{1\alpha}$, $\text{PGF}_{2\alpha}$) im Urin verschiedener Species (Mensch, Hund, Kaninchen) nachgewiesen (32, 58, 29). Für eine renale Synthese und gegen einen prärenalen Ursprung dieser Urinprostaglandine sprechen folgende Befunde:

(1) i.v. injiziertes markiertes PGE_2 oder $\text{PGF}_{2\alpha}$ wird nie unverändert, sondern immer metabolisiert (von der Lunge bzw. der Niere) ausgeschieden (34, 35).

(2) Die PG-Ausscheidung im Urin ($\text{PGF}_{2\alpha}$ und PGE_2) wird

durch intraarterielle bzw. intravenöse Infusionen von Arachidonsäure bzw. Angiotensin, welche die renale PG-Synthese steigern, bei verschiedenen Species (Mensch, Hund, Kaninchen) erhöht (32, 58).

Ein Eintritt der PG-s in die aufsteigende Henle'sche Schleife ist durch stop-flow-Experimente wahrscheinlich gemacht worden (125); die PG's würden auf diesem Weg mit allen Seiten des distalen Tubulus einschließlich der macula densa in Kontakt kommen. Die vor allem in den Epithelien der aufsteigenden Henle'schen Schleife und des distalen Konvoluts vorhandene PGDH hätte dabei eine strategische Lokalisation zur Inaktivierung der PG's (83).

Eine PG-Freisetzung in die Sammelrohre wäre wegen der sehr hohen PG-Synthetaseaktivität in den Sammelrohrepiethelien denkbar (45); die in diesen Zellen ebenfalls hohe PGDH-Aktivität könnte die Wirkung der dort gebildeten PG's direkt modulieren (83).

Für eine Freisetzung sowohl in die vasa recta wie in die Henle'sche Schleife bestehen bei den renomedullären Interstitialzellen elektronenmikroskopisch Anhalte (82); dieser Zelltyp besitzt neben einem gut ausgebildetem Golgi-Apparat und glattem endoplasmatischem Reticulum osmiophile Granula, die neutrale Lipide enthalten: "lipid droplets" (80). Die Anzahl der lipid droplets variiert mit der Salz- und Wasserbilanz und zeigt eine dosisabhängige Zunahme nach Hemmung der PG-Synthese durch Indomethacin, so daß hier ein "PG-precursor-store" vermutet wird (84, 18). In den lipid droplets selbst konnte allerdings keine PG-Synthetaseaktivität nachgewiesen werden (12).

Die hohe Aktivität der PGDH in der Nierenrinde könnte folgende Bedeutung haben: neben einer Inaktivierung von lokal, kortikal synthetisierten PG's oder medullär gebildeten und in den Tubulus freigesetz-

ten PG's könnte ihre physiologische Funktion darin bestehen -ähnlich wie es für andere Organe angenommen wird-, zirkulierende PG's zu inaktivieren. Darauf weist die weitere Lokalisation der PGDH in der tunica media der Arterien und der Arteriolen hin (83). Die PGDH böte somit für die sensitiven PG-Receptoren der Nierenrinde bzw. des Nierenmarks einen Schutz vor zirkulierenden PG's.

C Funktion der renalen Prostaglandine

Prostaglandine gehören zu den vasoaktivsten bekannten Substanzen. Sie verursachen je nach PG-Typ, Gefäßgebiet und Species entweder eine Vasokonstriktion oder eine Vasodilatation. Im Allgemeinen sind PGE:s und PGA:s Vasodilatoren, während Prostaglandine der F-Gruppe eine Vasokonstriktion vor allem der Kapazitätsgefäße bewirken (Lit.: 106).

Die renalen PG's sind primär Gewebshormone, ihre biologische Aktivität ist auf die Niere beschränkt. Insofern sie nicht in der Niere selbst inaktiviert werden, verlieren die PG's während einer einzigen Passage durch die Lunge ihre biologische Wirksamkeit (27, 70). PGA entgeht dieser pulmonalen Inaktivierung, doch eine physiologische Rolle von PGA als zirkulierendes renales Hormon ist sehr fragwürdig geworden, da im Nierengewebe bzw. im Plasma weder PGA selbst (massenspektrometrisch) noch seine Synthese (biochemisch) nachgewiesen werden konnte (59, 31). Verantwortlich für die PG-Ausscheidung im Urin sowie die hohe PG-Konzentration im Nierenvenenblut ist, wie oben erwähnt, das renale PG-System. Änderungen der renalen PG-Syntheseaktivität sollten sich daher in Änderungen des PG-Gehaltes von Urin oder Nierenvenenblut äußern.

Das in der Niere hauptsächlich gebildete PGE_2 ist primär für die intrarenale Hämodynamik von Bedeutung: es erhöht unter verschiedenen experimentellen Bedingungen den medullären und juxtamedullären Blutfluß und ist an der Regulation der Durchblutungsverteilung zwischen Mark und Rinde beteiligt.

Eine Stimulation der renalen PG-Synthese durch Infusion von Arachidonsäure in die Nierenarterie (Kaninchen, Hund) hat neben einer vermehrten PG-Ausscheidung im Urin vor allem einen Anstieg des juxtamedullären Blutflusses zur Folge; die Durchblutung der äußeren Zone der Rinde wird jedoch nicht beeinflusst. Insgesamt resultiert daraus ein erhöhter renaler Blutfluß (RBF). Indomethacinvorbehandlung verhindert diese Effekte einer stimulierten PG-Synthese (58, 16).

Die hämodynamischen Veränderungen in der isolierten, perfundierten Hundeniere sind ähnlich: neben einer kontinuierlichen Zunahme des RBF findet eine Prostaglandin-abhängige Umverteilung des renalen Blutflusses zum Mark hin statt: der Blutfluß in den inneren Zonen der Rinde wird erhöht, der in den äußeren Zonen relativ vermindert. Indomethacinapplikation bewirkt bei insgesamt reduziertem RBF eine entgegengesetzte Durchblutungsverteilung (117, 43).

Einerseits findet nach Einschränkung der renalen Perfusion durch Verminderung des arteriellen Druckes (hämorrhagische Hypotension oder schrittweise Aortenkonstriktion) eine Umverteilung des RBF zum Mark hin statt (15, 75). Andererseits ist nach Einschränkung der renalen Perfusion (durch Ischämie, Stenosierung der Nierenarterie, renale Vasokonstriktion durch Stimulation der Nierennerven oder durch Infusion von Noradrenalin, Angiotensin I, II oder Vasopressin) eine vermehrte Ausscheidung von PGE bzw. PGE-ähnlichen Sub-

stanzen in das Nierenvenenblut beschrieben worden (Lit.: 127). Dies legt einen Zusammenhang von vermehrt freigesetzten PG's und einem erhöhten juxtamedullärem RBF nach Einschränkung der renalen Perfusion nahe (58). Weiterhin ist bemerkenswert, daß intrarenale Infusionen von vasopressorischen Hormonen nach vorausgegangener Indomethacinapplikation eine verlängerte und verstärkte Vasokonstriktion zeigen (2). Somit fungieren die unter den Bedingungen einer eingeschränkten renalen Perfusion vermehrt freigesetzten PG's als Schutz zur Aufrechterhaltung der Nierendurchblutung (71), indem sie vor allem im juxtamedullären Rindenbereich den Gefäßwiderstand vermindern. Diese Widerstandsverminderung kann dabei direkt durch Wirkung an der glatten Muskelzelle oder indirekt über eine Sekretionshemmung von Noradrenalin an der neuromuskulären Synapse (68) erfolgen. Renale PG's wirken also bei Abnahme der renalen Perfusion pressorischen hormonalen bzw. neuralen Faktoren entgegen: dem adrenergen Nervensystem bzw. dem Renin-Angiotensin-System (72). Andererseits wird angenommen, daß renale PG's die Wirkung des vasodilatatorischen renalen Kallikrein-Kinin-Bradykinin-System vermitteln und verstärken (74). Somit übernehmen renale PG's bei der Modulation der Größe und Verteilung der renalen Durchblutung eine zentrale Funktion.

Bezüglich der Wirkung exogen zugeführter PG-s auf die Na- und H₂O-Exkretion liegen bei verschiedenen Species weitgehend übereinstimmende Befunde vor: intravenös bzw. intraarteriell injiziertes PGE oder PGA bewirkt eine Erhöhung des Urinvolumens und der Na-Exkretion, eine Verminderung der PAH-Extraktion, jedoch keine Änderung der glomerulären Filtration (Lit.: 127). Demgegenüber ist die Wirkung renal synthetisierter PG's auf die Na- und H₂O-Exkretion noch weitgehend unklar. Eine Übertragung der pharmakologischen Wirkung von in die

Nierenarterie infundierten PG's auf eine physiologische Funktion intrarenal gebildeter PG's ist jedoch nicht möglich, weil die Stimulation von PG-Rezeptoren durch endogen synthetisierte bzw. exogen zugeführte PG's generell verschieden ist: exogen zugeführte PG's erreichen über das arterielle Nierengefäßsystem entsprechend der Verteilung des renalen Blutflusses vorwiegend die Nierenrinde und sind dort biologisch wirksam; demgegenüber findet die endogene PG-Synthese hauptsächlich im Nierenmark, weniger in der Nierenrinde statt: die Wirkung endogen gebildeter PG's ist daher nicht primär im arteriellen Gefäßsystem der Nierenrinde lokalisiert.

Entsprechend den oben erwähnten Möglichkeiten der Freisetzung von endogen synthetisierten renalen PG's erscheinen folgende Wirkungsweisen auf die Na-Exkretion denkbar:

- (a) über ihre hämodynamische Wirkung, d. h. über die Erhöhung des medullären und juxtamedullären Blutflusses könnten sie auf Grund einer dadurch bedingten Verminderung des medullären Konzentrationsgradienten und/oder Erhöhung des hydrostatischen Druckes in den peritubulären Kapillaren natriuretisch wirken (24);
- (b) über eine direkte tubuläre Wirkung könnten die in die Henle'sche Schleife freigesetzten PG's auf Grund ihrer Eigenschaft, den Na-Transport an verschiedenen Membransystemen zu erhöhen, antinatriuretisch wirken (65, 6, 88, 89).
Ein weiterer Angriffspunkt wäre an den Sammelrohrepithelien gegeben, in denen nach neueren Untersuchungen durch PG's die aktive Na-Reabsorption gefördert werden könnte (107).

Für natriuretische wie für antinatriuretische Wirkungen endogener PG's gibt es tierexperimentelle Anhalte (54, 112). Teilweise können diese gegensätzlichen Wirkungen durch unterschiedliche experimentelle Bedingungen (Hydrationszustand der Versuchstiere, Narkose, positive- negative Na-Bilanz) erklärt werden, da Anhaltspunkte dafür vorliegen, daß der Nettoeffekt einer gesteigerten renalen PG-Synthese von allen diesen Faktoren abhängt (120).

Die Rolle der renalen PG's bei der Regulation der Wasserbalance scheint eindeutiger: so vermindert PGE die durch ADH bedingte Erhöhung der Wasserpermeabilität der Sammelrohre, indem es die ADH-bedingte Stimulation der Adenylcyclase verhindert (86, 7). Die hohe PG-Synthetase- und PGDH-Aktivität in den Sammelrohr epithelien wäre ein wichtiger biochemischer Anhalt für diese Interferenz mit dem ADH-System.

D Anpassung der Nierenfunktion nach akuter Nierenparenchymreduktion

(a) Modell der Uninephrektomie

Nach einseitiger Nephrektomie wächst die verbleibende Niere kompensatorisch durch Hypertrophie und Hyperplasie, die Anzahl der Nephrone bleibt jedoch konstant (79, 5, 46). Entsprechend dem kompensatorischen Wachstum ist eine gesteigerte Funktion der verbleibenden Niere festzustellen: es nehmen die Filtration (GFR) und die Na-Reabsorption einerseits sowie die Diurese und die Na-Ausscheidung andererseits zu (49, 123, 91). Bei Ratten,

bei denen die Anpassung der verbleibenden Niere nach Uninephrektomie bisher am genauesten untersucht wurde, nimmt die Reabsorptionsoberfläche (gemessen am Tubulusvolumen) im proximalen Tubulus entsprechend der Steigerung der proximalen Reabsorption zu. Für die erhöhte Reabsorption im distalen Tubulus ist jedoch außer der Tubulusvolumenzunahme, die nur halb so groß wie die des proximalen Tubulus ist, eine verkürzte Reabsorptionszeit verantwortlich (42). Damit übereinstimmend wurde nach Uninephrektomie bei Ratten im distalen Tubulus der Restniere eine viel größere Aktivitätszunahme der Na-K-ATP'ase als im proximalen Tubulus festgestellt (97).

Nicht nur das Wachstum der Nephronen, sondern auch die Durchblutungsverteilung in der kompensatorisch wachsenden Niere ist bei Ratten unproportional: so nimmt hier der renale Blutfluß (RBF) in den inneren Rindenzonen stärker zu als in den äußeren (100). Diesen Untersuchungen stehen Befunde am Hunde entgegen: hier ist das kompensatorische Wachstum sowie die Durchblutung von Mark und Rinde eine Woche nach Uninephrektomie proportional (76).

Die Zeitdauer bis zum Abschluß der kompensatorischen Funktionsanpassung der Restniere nach Uninephrektomie beträgt bei Hunden mindestens 3 - 4 Monate; bis zu diesem Zeitpunkt sind noch eine Zunahme der GFR und des RBF festzustellen (13, 64).

Am ersten Tag nach der Uninephrektomie ist bei Ratten ein großer Teil des kompensatorischen Nierenwachstums, gemessen an der Nierengewichtszunahme bereits erfolgt (49). Biochemische Frühveränderungen sind eine Steigerung des Phospholipidstoffwechsels innerhalb von 5 Minuten nach Uninephrektomie, sowie eine Steigerung des RNS-Stoffwechsels (nach 1 Stunde) und des Proteinstoff-

wechsels (nach 6h; 113, 114). Der noch für 2 Tage erhöhte Phospholipidstoffwechsel geht der besonders in den ersten Tagen erfolgenden Zunahme von Zellmembranen und Zellorganellen parallel (47, 60).

Bezüglich des Zeitpunktes der funktionellen Veränderungen, besonders der Erhöhung der GFR und der damit verbundenen Zunahme der Na-Reabsorption liegen unterschiedliche Befunde vor: einerseits wurde bereits innerhalb 30 Minuten nach Uninephrektomie eine Erhöhung der GFR festgestellt (87), andererseits in den ersten Stunden keine Veränderung der GFR gefunden, sondern erst nach 3 Tagen, nachdem die Zunahme der Nierenmasse bereits erfolgt war (49, 52). Für eine Erhöhung der GFR erst zu dem späteren Zeitpunkt sprechen Untersuchungen, in denen eine Zunahme des oxidativen Stoffwechsels, der mit dem Na-Transport eng korreliert ist, und eine Erhöhung der Na-Reabsorption sowie der Na-K-ATPase-Aktivität im proximalen Tubulus auch erst am 2. bzw. 3. Tag festgestellt wurde (51, 115, 97, 50). Hinsichtlich des Zeitpunktes der Erhöhung des RBF liegen ebenfalls unterschiedliche Befunde vor: einerseits wurde bei Hunden ein schon innerhalb weniger Minuten nach Uninephrektomie erhöhter RBF gefunden (55), andererseits war bei Ratten auch 4h nach Uninephrektomie kein erhöhter RBF festzustellen (87).

Die Mechanismen, die das kompensatorische Nierenwachstum initiieren, sind unbekannt. Neben hämodynamischen Änderungen (ein vermehrter RBF) und organspezifischen humoralen Substanzen, die die Nierenmasse kontrollieren (66, 124), werden die vermehrte reabsorptive und exkretorische Arbeit der Niere diskutiert (1). Diese als Arbeitshypertrophie bezeichnete Theorie der Anpassung der Nierenfunktion wird jedoch trotz des feinen Zusammenspiels von vermehrter Funktion und ver-

mehrtem Wachstum sehr in Frage gestellt; so konnte - neben der bei uninephrektomierten Ratten in der ersten Woche festgestellten Dissoziation von Nierengewichtszunahme und GFR-Erhöhung (49) - in Ureteropertitoneostomieversuchen, in denen die Niere eine starke GFR-Erhöhung und Na-Reabsorptionssteigerung zeigte, keine Zunahme des Nierengewichts festgestellt werden (123). Ebenfalls spricht gegen die Arbeitshypertrophie-theorie, daß die initial nach Uninephrektomie eintretende Erhöhung des Phospholipidstoffwechsels auch nach experimenteller Verminderung der GFR und der Na-Reabsorption nicht beeinflusst wurde (52).

(b) Rolle der renalen PG's für die Funktionsanpassung der Restniere

Zu untersuchen, inwieweit das intrarenale PG-System an der kompensatorischen Funktionssteigerung der Restniere nach Uninephrektomie beteiligt ist, war das Ziel der vorliegenden Arbeit. Grundsätzlich wären eine Steigerung des Phospholipidstoffwechsels, eine Vermehrung des renalen Blutflusses, der Natriumausscheidung und des Urinvolumens mit einer erhöhten intrarenalen PG-Synthese-Aktivität vereinbar. Die bisher einzige Studie über diese Fragestellung stammt von Nekrasova et al (82). Sie bestimmte den Gehalt von vasodilatatorischen, blutdrucksenkenden "PG-ähnlichen" Substanzen im Nierenmark und elektronenmikroskopisch die Menge der lipid droplets in den renomedullären Interstitialzellen bei normalen und uninephrektomierten Kaninchen. Auf Grund eines in den ersten 2 Wochen verminderten Gehaltes der PG-ähnlichen Substanzen und einer Abnahme der Anzahl der lipid droplets in den ersten beiden Tagen in der Restniere nach Uninephrektomie vermutete sie eine erhöhte PG-Synthese und Freisetzung besonders in den ersten Tagen. Um solche Ak-

tivitätsänderungen direkt nachweisen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit vor und nach Uninephrektomie die Ausscheidung von PGE im Urin gemessen. Als Versuchstiere wurden Kaninchen verwendet, da sie im Vergleich zu anderen Spezies eine hohe renale PG-Synthese-Aktivität und daher hohe PG-Konzentrationen im Urin aufweisen. Frühe, während der ersten Stunden nach Uninephrektomie erfolgende Änderungen der PGE-Ausscheidung der verbleibenden Niere wurde in akuten Versuchen an narkotisierten Tieren, spätere, während der ersten Woche erfolgende Änderungen in chronischen Experimenten an wachen Tieren untersucht. Voraussetzung für diese Experimente war der Aufbau einer möglichst spezifischen und sensitiven Methode für die Bestimmung von PGE im Urin.

E Quantitative Prostaglandin-Bestimmung (Tab. 1)

Für die quantitative Bestimmung der PG's gibt es eine Anzahl von Methoden unterschiedlicher Sensitivität bzw. Spezifität (4, Lit.: 90). Da Prostaglandine in den meisten Geweben und Gewebsflüssigkeiten jedoch nur in sehr geringen Konzentrationen (im menschlichen Serum und Urin 10^{-10} g/ml) vorhanden sind, scheiden hierfür einige Methoden wegen mangelnder Empfindlichkeit aus.

Das Nachweisprinzip des Bioassays, der die älteste Methode zur quantitativen Bestimmung von PG's in Gewebe und Gewebsflüssigkeiten darstellt, beruht auf der Eigenschaft der PG's, die glatte Muskulatur - je nach Gewebe und Prostaglandin-Typ quantitativ unterschiedlich - zu kontrahieren oder zu dilatieren. Durch eine kaskadenförmige Aneinanderreihung von glatten Muskelpräparationen verschiedener Organe und Spe-

Tabelle 1: Methoden der quantitativen PG-Bestimmung

Methode	Empfindlichkeit in $\mu\text{g/ml}$	Prostaglandine
Spektrophotometrie		
Ultraviolett (278 nm)	10^{-6}	E ¹ , A ¹ , B
Fluoreszenz	10^{-6}	E
Enzymassay	10^{-9}	E, F, A
Bioassay	10^{-9}	E, F, A
Radioimmunoassay	10^{-11}	E, F, A
Receptorassay	10^{-11}	E
Gaschromatographie		
Flammenionisationsdetektor	10^{-7}	E, F, A, B
Electron capture detector	10^{-10}	E, F, A, B
Massenspektrometrie	10^{-10}	E, F, A, B

¹ nach Konversion zu PGB

zies zu einem Bioassay-System ist eine gewisse Spezifität des zu messenden Prostaglandins auch ohne vorherige Extraktion und chromatographische Trennung der biologischen Proben gewährleistet; ein solches Bioassay-System wurde für kontinuierliche Messungen der renalen PGE-Ausscheidung in das Nierenvenenblut verwendet (73): Beim Gebrauch nur einer glatten Muskel-Präparation ist die Extraktion und chromatographische Auftrennung der zu messenden biologischen Proben erforderlich.

Beim enzymatischen Nachweis von PG's wird die NAD-abhängige 15-OH-PGDH benützt, welche die Oxidation der 15-OH-Gruppe der primären PG's katalysiert. Bei dieser Reaktion wird NADH gebildet, das fluoreszenzspektrometrisch nachgewiesen werden kann. Die Empfindlichkeit des Assays wird durch Kopplung mit einem zyklischen Enzymsystem, das die Menge des gebildeten NADH vervielfacht, gesteigert. Das Haupthindernis einer Anwendung dieses potentiell sehr empfindlichen Assays besteht in der Instabilität und Verunreinigung der verfügbaren Enzympräparationen.

Der Radioimmunoassay (RIA) wird bisher vor allem für PG-Bestimmungen im Blutplasma verwendet (110, 109, 129, 22, 44). Die schnelle und leichte Durchführbarkeit ermöglicht einen großen Probendurchsatz; außerdem gehört der Radioimmunoassay zu den empfindlichsten PG-Bestimmungsmethoden. Allerdings ist seine Anwendung wegen der teilweise geringen Spezifität der produzierten Antikörper und der möglichen Kreuzreaktionen mit anderen, noch unbekannten PG-ähnlichen Substanzen in den biologischen Proben begrenzt. Am zuverlässigsten scheinen bisher die Radioimmunoassays für PGF und PGF-Metabolite zu sein, deren Antiseren im allgemeinen von hoher Spezifität sind. So konnte im Humanurin radioimmunolo-

gisch gemessenes PGF mit massenspektrometrisch bestimmten Werten korreliert werden (32). Allerdings fielen radioimmunologische PGF-Bestimmungen von Standardplasma-Proben, die an verschiedene Laboratorien verschickt und dort jeweils mit eigenen PGF-Radioimmunoassays gemessen wurden, sehr unterschiedlich aus (94).

Bezüglich des RIA für PGE besteht generell die Schwierigkeit, PGE-spezifische Antikörper zu produzieren: viele Antikörper, die man nach Impfung mit PGE-Konjugaten erhält, sind spezifisch gegen PGB, jedoch nicht gegen PGE gerichtet. Dies wird durch eine bei der Konjugierung erfolgende Dehydratation von PGE zu PGA erklärt, insbesondere wenn Carbodiimid bei der Konjugierung verwendet wird (63). Die weitere Konversion von PGA zu PGB könnte dann nach der Injektion des Konjugats durch die im Plasma vorhandene PGA-Isomerase erfolgen (96).

Mit dem Radioimmunoassay prinzipiell vergleichbar, aber spezifischer als dieser ist der PG-Rezeptorassay: Magengewebe und Leberplasmamembranen von Ratten besitzen sehr spezifische Rezeptoren für PGE (101, 30, 78). Der Rezeptorassay mit Leberplasmamembranen wurde bislang von Fröhlich et al für PGE-Bestimmungen im Urin von Mensch und Hund verwendet und konnte mit massenspektrometrisch gemessenen Werten korreliert werden (32).

Die gaschromatographischen Methoden, besonders die kombinierte Gaschromatographie-Massenspektrometrie, sind die empfindlichsten, spezifischsten und genauesten Methoden (96). Allerdings erfordern sie außer dem apparativen Aufwand wegen der notwendigen vorhergehenden Reinigung und Derivatisierung der biologischen Proben auch einen erheblich zeitlichen Aufwand.

III PGE-Analyse im Kaninchen- und Humanurin

A Methodik

a) Gewinnung der Urine

In chronischen Tierexperimenten wurden von Kaninchen, die in Stoffwechselkäfigen gehalten wurden, 24 -h- Urine bei Raumtemperatur gesammelt. Der Wechsel der täglichen Sammelperioden fand morgens statt. Nach Messung des Urinvolumens wurde ein 40-ml-Aliquot eingefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C gelagert. In diesem Zustand sind wässrige Lösungen von PGE bis zu einem Monat stabil (14); über die Stabilität von PGE im Urin unter diesen Bedingungen ist bisher nichts bekannt. In eigenen Untersuchungen konnte festgestellt werden, daß 24-h Sammelurine, die in einem durch Trockeneis gekühltem Sammelgefäß sofort gefroren wurden, nicht meßbar mehr PGE-Aktivität enthielten, als die 24-h Urine, die bei Raumtemperatur gesammelt wurden, so daß auf das sofortige Einfrieren des Urins während des Sammelns verzichtet werden konnte. In der PGE-Aktivität von sofort aufgearbeiteten Urinen und zuerst bei -20°C gelagerten Urinen waren ebenfalls keine Unterschiede festzustellen.

In Akut-Versuchen an narkotisierten Kaninchen wurde Ureterurin in 30-Minuten-Abständen gesammelt. Dieser Urin war immer etwas blutig tingiert, was durch bei der Kanülierung der Ureter erfolgte Verletzungen der bei Kaninchen besonders gefäßreichen Ureterschleimhaut verursacht war.

Aus diesem Grunde wurde zur Hemmung möglicher PGE-Freisetzung aus im Blut enthaltenen Thrombocyten, die reich an PG-synthetisierenden Enzymen sind (39), Indomethacin (1 mg) zu den Sammelröhrchen dazugegeben. Die Ureterurine wurden nach Abzentrifugation des Blutes sofort bei -20°C eingefroren.

b) Aufbereitung der Urine

(α) Extraktion

Die tiefgefrorenen Urine wurden aufgetaut, geschüttelt und zentrifugiert. Sämtliche Extraktionsschritte erfolgten in Glasgefäßen. Größere Urinvolumina ($> 2\text{ ml}$) wurden in Scheidetrichtern, kleinere in Reagenzgläsern extrahiert. Entsprechend der größeren PGE-Konzentration im Kaninchenurin im Vergleich zu Humanurin wurden zur PGE-Messung im Kaninchen-24 h-Urin nur 15 ml Urin benötigt, zur PGE-Messung im Humanurin jedoch mindestens 40 ml. Die Urinvolumina der in Akutversuchen an Kaninchen halbstündlich gesammelten Ureterurine waren kleiner (0,5 - 8 ml), sie reichten jedoch zur PGE-Bestimmung aus.

Zur Bestimmung der Recovery wurde Tritium-markiertes PGE zu den Urinen gegeben. Prinzipiell sind dafür sowohl ^3H -PGE₁ als auch ^3H -PGE₂ geeignet, da bei den verwendeten Trennungsmethoden beide Substanzen gleiches chromatographisches Verhalten zeigen. Nach anfangs paralleler Verwendung stellte sich jedoch (5,6) ^3H -PGE₁ als besser heraus, da es stabiler war und außerdem für Recovery-Messungen bei PGE-Messungen im PGB-Radioimmunoassay angewendet werden konnte (siehe S.40).

Die Menge der zu den Urinen gegebenen Aktivität hing

von der Methode der PGE-Analyse ab: bei PGE-Messung im Bioassay wurde eine größere Aktivität (20 000 - 30 000 cpm) zugesetzt, um den durch die Messung der Recovery bedingten PGE-Verlust der Proben möglichst klein zu halten. Bei PG-Messung im Radioimmunoassay wurde die für die Recovery-Messung hinzugegebene Traceraktivität so niedrig gewählt, daß die Traceraktivität in den zu messenden Proben (< 200 cpm) im Vergleich zur Aktivität des Radioimmunoassays (8000 cpm) vernachlässigt werden konnte. Versuche, durch Verwendung von ^{14}C -PGE₂ zur Recovery-Bestimmung mit anschließender Doppelisotopenmessung der Radioimmunoassayproben dieses Problem zu umgehen, scheiterten an der geringen spezifischen Aktivität des ^{14}C -markierten Prostaglandins und der dadurch bedingten interferierenden Reaktion mit dem Antikörper.

Nach Zugabe von ^3H -PGE₁, das zur Erhaltung möglichst langer Stabilität in Äthanol bei -20°C gelagert wurde (14), wurden zur Überführung der Prostaglandine in die fettlösliche undissoziierte Form - die Urine mittels 10 %iger Ameisensäure bis pH 3,2 (pH-Papier) vorsichtig angesäuert. Bei zu starker Ansäuerung besteht die Gefahr der Dehydratation von PGE zu PGA (98). Die angesäuerten Urine wurden zweimal mit gleichem Volumen Chloroform geschüttelt und extrahiert. Wenn die organische und wässrige Phase sich nicht trennten und ein schaumiges Urin-Chloroform-Gemisch entstand, wurde zur Phasentrennung entweder (bei Verwendung von Scheidetrichtern) ein Überschuß Chloroform oder etwas Äthanol dazugegeben, oder es wurde zentrifugiert (bei Verwendung von Reagenzgläsern). Die Chloroform-Phase wurde in 50 ml- bzw. 100 ml-Spitzkolben aufgefangen und in einem Rotationsverdampfer bei 35°C eingedampft.

(B) Chromatographische Trennung der Prostaglandine

1 Kieselgelsäulenchromatographie (Abb. 2)

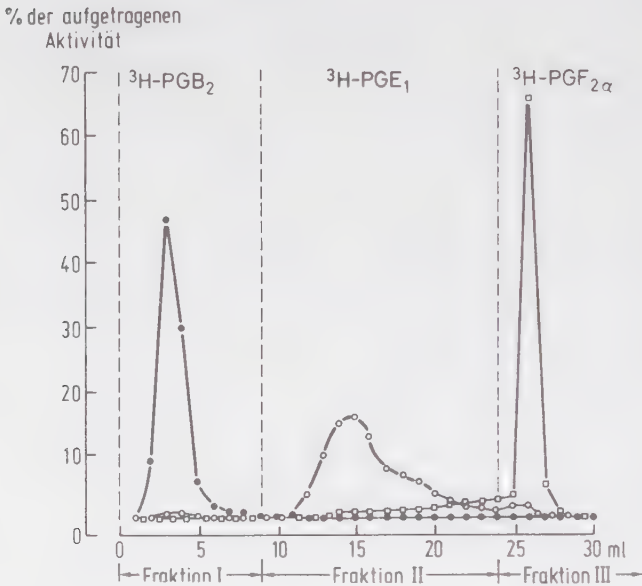


Abb. 2

Chromatographische Trennung der PG's an der Kieselgelsäule

Abszisse: Elutionsvolumen in ml

Ordinate: Aktivität pro ml in %

Die markierten PG's (10 000 cpm) wurden jeweils in einem Extrakt von 10 ml Kaninchenurin auf die Säule aufgetragen

Die extrahierten Prostaglandine wurden an einer Kieselgelsäule (Unisil 100-200 mesh Fa. Clarkson, USA) mit einem nach Jaffe modifiziertem Elutionssystem in die Gruppen PGA /B, PGE und PGF getrennt (44). Dazu wurde 0,5 g Unisil mit dem ersten Elutionsmittel (LM I) aufgeschlemmt und diese Suspension in Glassäulen (0,3 x 30 cm), deren Ausgang mit kleinen Wattekugeln verschlossen war, gefüllt. Die eingedampften Proben wurden zur besseren Lösung zuerst in dem polaren Lösungsmittel IV (0.2 ml) aufgenommen und in einem Vortex^R-Mixer geschüttelt; anschließend wurde von dem ersten Elutionsmittel (LM I) 0,6 ml hinzugefügt und die Proben vorsichtig auf die Kieselgelsäule gebracht.

Folgendes Elutionssystem wurde verwendet:

LM ⁺	Benzol/Es- sigsäure- äthylester/ Methanol	V ⁺⁺	Frak- tion	% - Verteilung von			Po- la- ri- tät
				³ H-PGB ₂	³ H-PGE ₁	³ H-PGF ₂	
I	60:40	9 ml	I	96	4	2	↓
II	60:40:2	15 ml	II	4	92	22	
III	60:40:20	5 ml	III	0	4	76	
IV	60:40:10						

⁺LM = Lösungsmittel

⁺⁺V = Elutionsvolumen

Die Abtrennung von ³H-PGF_{2α} ist am unschärfsten. Für die Ergebnisse ist dies jedoch ohne Bedeutung, da PGF nur eine sehr geringe biologische Aktivität am rat fundus strip besitzt (etwa 1/10 der von PGE (105)), und nur eine geringe Kreuzreaktion mit dem verwendeten PGB-Antikörper zeigt.

Fraktion II wurde in Spitzkolben aufgefangen und im Ro-

tationsverdampfer bei 35° C eingedampft, anschließend in 0,5 ml Essigsäureäthylester gelöst und bei -20° C unter N₂ bis zur Messung im Radioimmunoassay oder Bioassay gelagert. PGE ist bei Lagerung in dieser Form bis zu 3 Monaten stabil (99). Bei PGE-Analysen im Bioassay wurden für Recovery-Messungen jeweils 2 x 0.01 ml dieser Lösung in Szintillationsgefäße gegeben, die 10 ml einer Toluol-Szintillationslösung (2.5 l Toluol für Szintillationszwecke, 10.65 g PPO, 0,275 g Popop) enthielten. Die Aktivität des Tritium-markierten PGE wurde in einem β -Zähler (Fa. Beckmann) gemessen.

2 Dünnschichtchromatographie (Abb. 3)

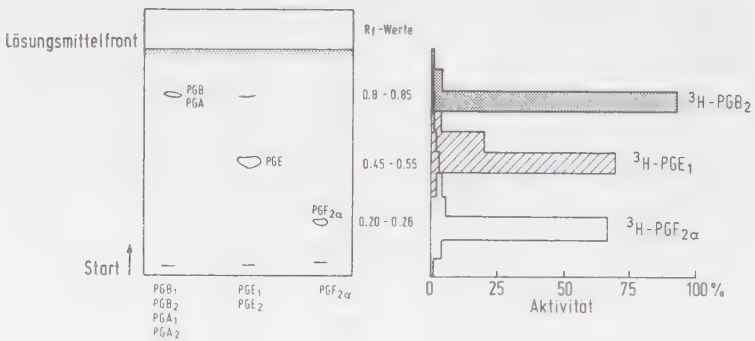


Abb. 3

Dünnschichtchromatographische Trennung von PG-Rein-substanzen.

Unmarkierte PG's (links) wurden nach Besprühen mit Phosphomolybdänsäure in Äthanol als grau-braune Flecken sichtbar.

Die Aktivität von markierten PG's (rechts) wurde nach Auskratzen von 1.5 cm breiten Streifen und Auswaschen mit Methanol im Szintillationszähler gemessen.

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie wurde die Reinheit von unmarkierten PG's qualitativ und von markierten PG's quantitativ geprüft. Die Substanzen wurden nach Lösung in 0,05 ml Äthanol auf Kieselgelplatten aufgetragen (DC-Fertigplatten Kieselgel 60, Fa. Merck). Von unmarkierten PG's wurden für den späteren Farbnachweis mindestens 0,02 mg benötigt; von markierten PG's wurde entweder eine geringe Aktivitätsmenge (10 000 - 20 000 cpm) - bei späterer Messung im β -Zähler - oder eine größere Aktivitätsmenge (500 000 cpm) - bei späterer Messung mit einem Dünnschicht-Radioscanner - aufgetragen. Die Dünnschichtplatten wurden nach Auftreten der Substanzen und Verdampfen des Äthanols senkrecht in eine mit dem Lösungsmittelsystem gefüllte Glaswanne gestellt und diese verschlossen. Folgendes Lösungsmittelsystem wurde verwendet: Chloroform/Methanol/konz. Essigsäure 72:4:4 (ml). Nach einer Laufzeit von 1 1/2 h wurden die Platten im Trockenschrank bei 110° C für 5 Min. erhitzt und anschließend mit 10 %iger Phosphomolybdänsäure in Äthanol besprüht, wodurch die PG's als graubraune Flecken auf gelbem Grund sichtbar wurden. Die markierten PG's wurden bei geringer Aktivität nach Abkratzen von 1,5 cm breiten Streifen aus dem Kieselgel mit Methanol ausgewaschen und ihre Aktivität nach Zugabe von Toluol-Szintillationslösung im β -Zähler bestimmt.

Die Prostaglandine trennten sich entsprechend der unterschiedlichen Polarität des Zyklopentanringes nacheinander in die Hauptgruppen PGF, PGE und PGA/B. Markiertes PGE, das mehr als 10 % durch Oxydation zu PGA/B verunreinigt war, wurde über eine LH-20 Sephadexsäule gereinigt.

Bemerkenswert ist, daß frischgeöffnete Prostin-E₂^R Ampullen (Fa. Upjohn; PGE₂) sowie aus PGE-Trockensubstanz (Fa. Upjohn) in absolutem Äthanol bereitete Lösungen gerings, aber sichtbar mit PGA /B verunreinigt waren, obwohl sie bei -20° C gelagert waren.

3 Säulenchromatographie an Sephadex LH-20 (Abb. 4)

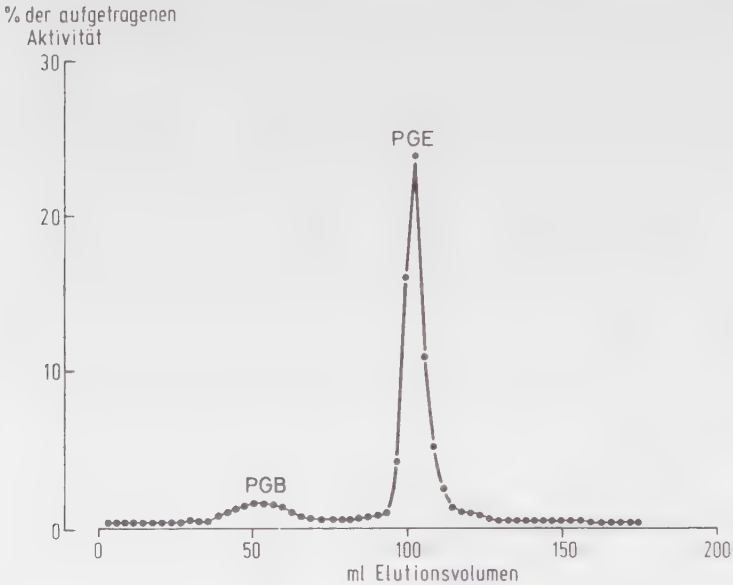


Abb. 4

Säulenchromatographie an Sephadex LH-20 von teilweise oxidiertem ^3H -PGE₂ (10 000 cpm)

Abszisse: Elutionsvolumen in ml

Ordinate: Aktivität pro 3 ml in %

Die LH-20-Sephadexsäule besitzt gegenüber der Kieselgelsäule den Vorteil einer größeren Recovery (95 %), wenn Tritium-markierte Prostaglandine, die wegen ihrer hohen spezifischen Aktivität in quantitativ sehr geringer Menge (pg) vorliegen, ohne die Anwesenheit von Begleitfetten aus extrahierten Urinen oder von unmar-

kierten Prostaglandinen chromatographisch getrennt werden. Die LH-20-Sephadexsäule wurde daher für die Reinigung von verunreinigtem, Tritium-markiertem PGE benutzt. Dazu wurde LH- 20 Sephadex (20 g) für 2 h mit einem Gemisch von 5 % Methanol in Dichlormethan (150 ml) äquilibriert und die Suspension unter freiem Fluß auf eine Glassäule (80 x 1 cm) gepackt, deren Ausgang durch Watte verschlossen war (126). Anschließend wurde verunreinigtes $^3\text{H-PGE}_1$, bzw. $^3\text{H-PGE}_2$ (10 000 cpm) aufgetragen und mit 150 ml 5 % Methanol in Dichlormethan eluiert. Das Eluat wurde in 3 ml-Portionen aufgefangen und die Aktivität im β -Zähler gemessen. Anschließend wurde - entsprechend dem erhaltenen Chromatogramm - eine große Aktivitätsmenge von $^3\text{H-PGE}_1$ bzw. $^3\text{H-PGE}_2$ gereinigt.

c) Quantitative Bestimmung von PGE

(α) Biologische PGE-Analyse

Die biologische Aktivität von PGE an glatter Muskulatur verschiedener Organe kann zu seiner quantitativen Bestimmung genutzt werden. Hier wurde der "rat fundus strip" verwendet, an dem PGE mit steigender Konzentration zunehmend stärkere Kontraktionen hervorruft (122).

Von weiblichen Wistarratten (200 g) wurde nach Narkose mit Inactin (10 mg/100 g KG) der Magen entnommen, der Fundus abgetrennt und längs der großen Krümmung 2 - 3 ca. 20 mm lange und 3 mm breite Streifen herausgeschnitten, die bis zur weiteren Verwendung in Tyrodelösung (37°C) gelegt wurden. Für die Messung von PGE im Kaninchen- und Humanurin standen entsprechend ihrer unterschiedlichen PGE-Konzentration 2 verschiedene Kammer zur Verfügung: eine große Kammer (15 ml), die eine mit Carbogen getriebene Rezirkulationskammer darstellte, wurde für die PGE-Analyse im Kaninchenurin verwen-

det (Abb. 5); eine kleine Kammer (1.5 ml), deren Badlösung über eine kleine Nadel mit Carbogen versorgt wurde, wurde für die PGE-Analyse im Humanurin benutzt.

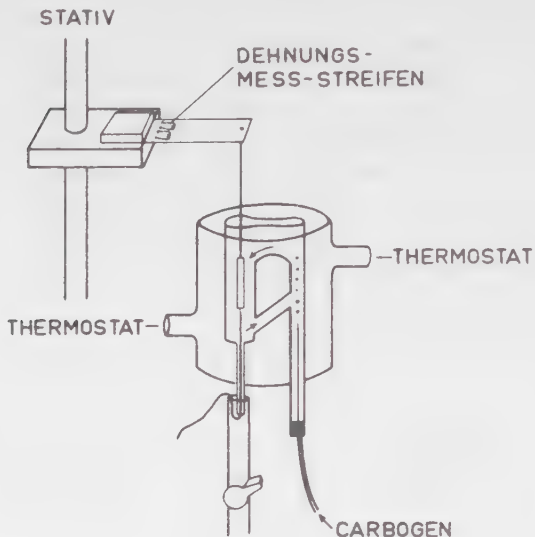


Abb. 5

Anordnung zur biologischen Messung von PGE über die Spannungsänderung des rat fundus strip

Von den Magenstreifen wurde das untere Ende in der großen Kammer an einen Steg festgeklemmt, in der kleinen Kammer mit einem kurzen Seidenfaden an der kleinen Nadel befestigt; das obere Ende der Magenstreifen wurde jeweils über einen Seidenfaden an einem Dehnungsmeßstreifen befestigt (Fa. Swema, Schweden), der die Kontraktionen über einen Verstärker auf einen Direktschreiber (Fa. Schwarzer) übertrug.

In den Kammern wurden die Magenstreifen von Tyrodelösung, die von einem Wasserbad auf 37° erwärmt wurde, umspült und mit Carbogen (95 % O_2 , 5 % CO_2) begast. Die Tyrodelösung hatte folgende Zusammensetzung (mmol/l): NaCl 139.2, KCl 2.7, $CaCl_2$ 1.8, $MgCl_2$ 0.49, $NaHCO_3$ 11.9, NaH_2PO_4 0.4, und Glucose 5.5.

Eine Stunde hingen die Magenstreifen ohne Vordehnung zur Äquilibrierung in der Tyrodelösung. Anschließend wurden sie auf 0.5 g einmal vorgedehnt; nach weiteren 10 Min. wurde mit der Eichung begonnen.

Zur Herstellung der PGE_2 -Eichlösungen wurden Prostin^R E_2 -Ampullen (0.5 mg PGE_2 , 1 mg/ml; Fa. Upjohn) verwendet. Die Endverdünnungen lagen in 0.9 %iger NaCl-Lösung vor und wurden nicht länger als einen Monat bei $-20^{\circ} C$ aufbewahrt.

Die Urin-PGE-Proben, die bei $-20^{\circ} C$ gelagert waren, wurden für die Messung im Bioassay nach Verdampfen des Essigsäureäthylesters in 0.2 ml Tyrode gelöst.

Nach Zugabe der Substanzen wurden ca. 3 Min. für die Kontraktion, nach 1 - 2-mal Spülen 5 - 7 Min. für die erneute Äquilibrierung der Magenstreifen benötigt. Die Spontanaktivität und auch die Kontraktionsstärke der Magenstreifen hingen von der Stärke der Carbogen-Begasung ab: ohne Begasung war keine Spontanaktivität nachweisbar und die Kontraktionsstärke war geringer. Weiterhin änderte sich die Empfindlichkeit der Magenstreifen während der Messung: sie wurde während der ersten Stunde größer, um dann wieder langsam abzunehmen. Eine einmalige Eichung des Magenstreifens reichte daher zur Bestimmung des PGE -Gehaltes der unbekannten Proben nicht aus: der PGE -Gehalt der Proben wurde durch eingabelnde PGE -Eichkonzentrationen bestimmt (Abb. 6).

Die untere Nachweisgrenze in diesem Bioassay lag bei

10 - 20 ng PGE_2 für die große Kammer und entsprechend dem 10-fach kleineren Volumen bei 1 - 2 ng für die kleine Kammer. Die obere Meßgrenze war 150 ng PGE_2 für die große und 15 ng für die kleine Kammer.

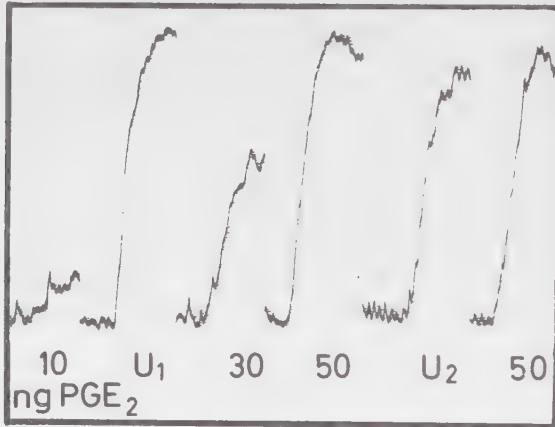


Abb. 6

Dosisabhängige Kontraktionen des rat fundus strip nach Zugabe von PGE_2 und unbekannten Urinproben (U_1 , U_2)

Um bei der Aufarbeitung der Urine erfolgende Verluste der biologischen Aktivität von PGE_2 zu erfassen, wurden vor der Extraktion steigende Mengen PGE_2 zu jeweils 10 ml Humanurin gegeben und nach Aufarbeitung der Urine der PGE -Gehalt im Bioassay bestimmt (Abb. 7). Die Recovery wurde bei der Auswertung berücksichtigt.

Messung des Variations-Koeffizienten

Zur Messung der Genauigkeit der biologischen PGE -Bestimmung wurden die PGE -Konzentrationen von 80 verschiedenen Kaninchenurinen doppelt bestimmt: die gleichen

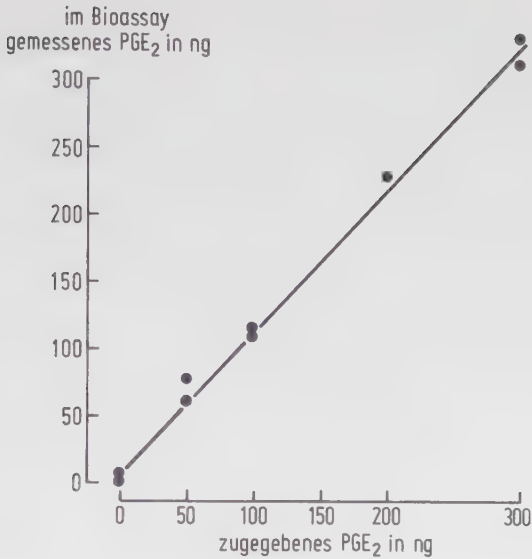


Abb. 7

Recovery von exogenem PGE₂ aus Urin

Abszisse: zu 10 ml Humanurin zugegebenes PGE₂

Ordinate: im Bioassay gemessenes PGE₂

Urine wurden jeweils an verschiedenen Tagen aufgearbeitet und ihr PGE-Gehalt in separaten Bioassays gemessen; der mittlere Variationskoeffizient in dem gemessenen Konzentrationsbereich von 2 - 40 ng PGE/ml Urin betrug 20,4 %.

(B) Radioimmunologische PGE-Analyse

1 Methode und Materialien

Zur Gewinnung von PGE_2 -Antikörpern war Kaninchen mehrmals ein PGE_2 -Rinderserumalbumin-Konjugat intravenös injiziert worden. Es stellte sich jedoch heraus, daß die Antikörper nicht spezifisch gegen PGE_2 , sondern gegen PGB_2 gerichtet waren. Mit PGB zeigte das PGB_2 -Antiserum eine praktisch 100 %ige Kreuzreaktion. Dahingegen lagen die Kreuzreaktionen mit PGE_2 bzw. $\text{PGF}_{2\alpha}$ nur bei 1 %, bzw. 0,01 % (Abb. 8). Die Endverdünnung des Antiserums zur Erzielung einer 50 %-Bindung mit $^3\text{H-PGB}_2$ betrug 1:6600 im Reaktionsansatz.

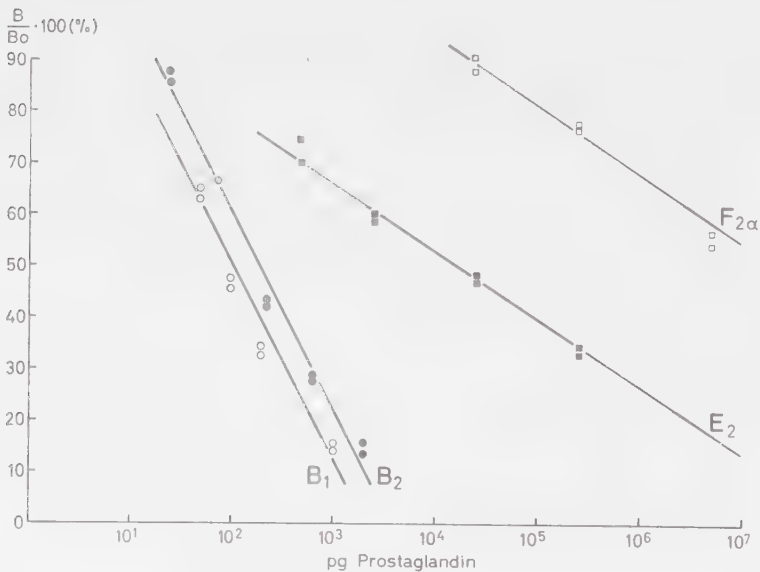


Abb. 8

Kreuzreaktionen des PGB_2 -Antikörpers mit PGB_1 , PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$

Abszisse: PGB_1 , PGB_2 , PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ in pg

Ordinate: Prozentuale Bindung des radioaktiv markierten $^3\text{H-PGB}_2$ an den Antikörper

Als weitere Reagenzien wurden folgende Substanzen verwendet:

^3H - $^1\text{GB}_2$ (Fa. Amersham); pro Reaktionsansatz wurden 8000 cpm eingesetzt.

PGB_2 (Fa. Amersham); die hiervon in Phosphatpuffer (pH 6.8) angesetzten Eichlösungen lagen im Bereich von 30 - 2500 pg PGB_2 pro Reaktionsansatz

RIA-

Puffer: 25 ml Reagenz A (15 g Tris (hydroxymethyl) aminomethan.
+ 20,4 g NaCl + 250 ml Aqua bidest)
+ 0.25 g Gelatine
+ 225 ml Aqua bidest
der Puffer wurde zur Lösung der Gelatine erhitzt und mit konz. Salzsäure auf pH 7.4 eingestellt.

Anti-Kaninchen - γ - Globulin-Serum vom Esel (Fa. Wellcome)
1:20 verdünnt mit RIA-Puffer; (zur Präzipitation des spezifischen PGB_2 -Antikörpers)

Kaninchennormalserum

1:100 verdünnt mit RIA-Puffer.

Alle Reagenzien außer dem Esel-anti- γ -Globulin-Serum (bei 4° C) wurden bei -20° C aufbewahrt. Der RIA-Puffer wurde alle 2 Tage neu angesetzt.

Der Radioimmunoassay (3-fach-Werte) wurde folgendermaßen durchgeführt: in Eppendorffgefäße wurden 1 ml RIA-Puffer, 0.05 ml PGB_2 -Eichlösung oder unbekannte Probe und 0.05 ml ^3H - PGB_2 pipettiert. Nach Zugabe von 0.02 ml Antiserum wurden die Proben nach Schütteln für 1 1/2 h bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden der 2. Antikörper (0.1 ml Anti- γ -Globulin-Serum) und das Kanin-

chennormalserum (0.1 ml) dazupipettiert und die Proben nach Schütteln für 20 h bei $+4^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach Zentrifugation (30 Min. bei 3000 rpm und 4°C) wurde der präzipitierte Ag-Ak-Komplex als weißer Niederschlag auf dem Boden der Eppendorfgefäße sichtbar. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen, der Niederschlag mit 1 ml 0.1 n-NaOH aufgelöst und in 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Unisolve^R) gegeben. Nachdem die durch Zugabe der alkalischen Lösung erfolgende Chemolumineszenz abgeklungen war (12 h), wurde die Aktivität der Proben im β -Zähler gemessen.

Die radioimmunologischen Meßwerte wurden elektronisch mittels Spline-Funktionen ausgewertet (69).

2 Radioimmunologische Bestimmung von PGE im Kaninchenurin

Die in Fraktion II erhaltenen Urin-PGE-Proben müssen zur Messung im PGB_2 -Radioimmunoassay in PGB überführt werden. Dazu wurden mehrere Konversionsreaktionen untersucht, wobei die Konversion mit methanolischer KOH sich als die einzig geeignete erwies (siehe S. 43). Die bei -20°C gelagerten Urin-PGE-Proben wurden - nach Verdampfen des Essigsäureäthylesters durch N_2 -Begasung - in 1M-KOH in Methanol gelöst, geschüttelt und 30 Min. bei 37°C inkubiert. Bevor das auf diese Weise erhaltene PGB im RIA bestimmt werden konnte, mußte es aus der methanolischen Phase extrahiert werden; dazu wurde die methanolische KOH mit 3 ml 5 %iger Ameisensäure bis pH 3.2 angesäuert und das PGB 2-mal mit 4 ml Essigsäureäthylester extrahiert. Nach Verdampfen des Essigsäureäthylester bei 35°C im Rotationsverdampfer wurden die Proben in dem RIA-Puffer gelöst und nach Überprüfung des pH-Wertes in Aliquots von 0.05 ml eingesetzt.

Der bei der Extraktion aus der methanolischen KOH erfolgte PG-Verlust war minimal: die Recovery, gemessen mit (5, 6, 11, 14, 15) ^3H -PGB₂, (5,6) ^3H -PGE₁ oder ^{14}C -PGE₂ betrug $95 \pm 4,4 \%$ (SD, n=20). Es muß darauf hingewiesen werden, daß bei Verwendung von (5, 6, 8, 11, 12, 14, 15) ^3H -PGE₂ zur Messung der Recovery artifiziell zu niedrige Werte erhalten werden, da bei der Konversion von PGE zu PGB eine Dehydrierung an den tritierten Positionen C₈ und C₁₂ erfolgt.

Zur Prüfung der Spezifität der radioimmunologischen PGE-Bestimmung im Kaninchenurin wurden zwei 15 ml-Aliquots aus einem Pool von 24h-Urinen verschiedener Kaninchen extrahiert und säulenchromatographisch getrennt; die PGE-enhaltende Fraktion II wurde entweder sofort, ohne Konversion zu PGB oder erst nach Konversion zu PGB in steigenden Mengen im RIA eingesetzt. Die Recovery wurde bei der Auswertung berücksichtigt. Wie die Abbildung 9 zeigt, bindet der PGE₂-Antikörper die Proben nur nach Konversion- die unkonvertierten Proben zeigen eine nachweisbare Bindung erst bei sehr großen eingesetzten Mengen; diese unspezifische Bindung ist unerheblich, da die zur Messung im RIA eingesetzten Urinvolumina im allgemeinen kleiner als 0.3 ml waren.

Zur Prüfung der Reproduzierbarkeit des Radioimmunoassays wurden 5 Urin-Aliquots aus einem Pool von 24-h-Urinen an verschiedenen Tagen aufgearbeitet und in verschiedenen RIA-Ansätzen gemessen. Der Interassay-Variationskoeffizient bei einer mittleren PGE-Konzentration von 6.9 ng/ml betrug 6.4 %.

3 Radioimmunologische Bestimmung von PGE im Humanurin

Zur Prüfung der Spezifität der radioimmunologischen PGE-Bestimmung im Humanurin wurde von zwei 20 ml-Ali-

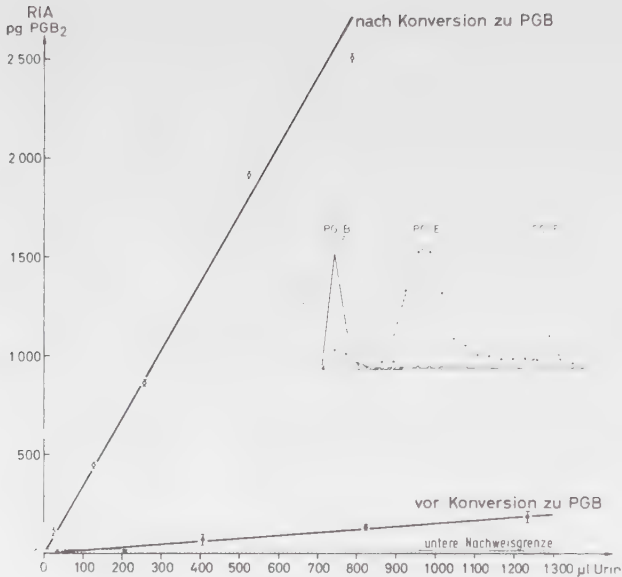


Abb. 9

Prüfung der Spezifität der radioimmunologischen PGE-Messung im Kaninchenurin. Vergleich der Bindung der PGE-enthaltenden Fraktion II an den PGB₂-Antikörper vor und nach Konversion zu PGB.

Abszisse: Urinvolumen in ml

Ordinate: PGE in pg

Quots eines Urin-Pools nach Extraktion und chromatographischer Trennung, die PGE-enthaltende Fraktion II entweder sofort, ohne Konversion, oder erst nach Konversion zu PGB in steigenden Mengen im RIA eingesetzt. Wie die Abb. 10 zeigt, besteht im Gegensatz zu der radioimmunologischen PGE-Bestimmung im Kaninchenurin schon vor Konversion eine beträchtliche Bindung des PGB-Antikörpers an Substanzen der Fraktion II und nur eine geringgradig stärkere Bindung nach Konversion.

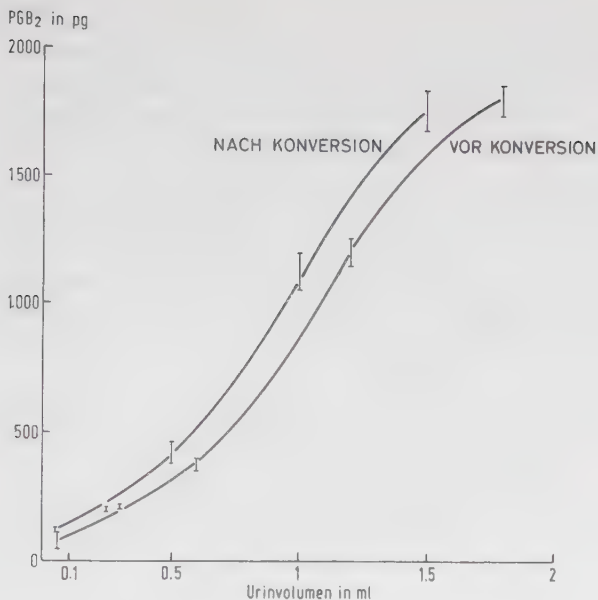


Abb. 10

Prüfung der Spezifität der radioimmunologischen PGE-Messung im Humanurin. Vergleich der Bindung der PGE-enthaltenden Fraktion II an den PGB₂-Antikörper vor und nach Konversion zu PGB.

Abszisse: Urinvolumen in ml

Ordinate: PGB₂ in pg

Versuche, diese chromatographisch sich wie PGE und immunologisch sich wie PGB verhaltende Substanz oder Substanzen über eine zweite Kieselgelsäule von dem nach der Konversion erhaltenen Urin-PGB abzutrennen, blieben ohne Erfolg. Auch brachte eine veränderte Extraktionsmethode nach Fröhlich (32) zur besseren Abtrennung der Prostaglandine von anderen im Urin vor-

handenen Lipiden (Ausschütteln des Urins mit Benzol-Butylchlorid bei pH 6.5, Extraktion mit Chloroform, Reinigung des Extraktes über eine LH-20-Sephadexsäule sowie anschließende Gruppentrennung an einer Kieselgelsäule) keine Verbesserung: das Verhältnis der Bindung an den PGB-Antikörper der in Fraktion II enthaltenen Substanzen vor und nach der Konversion blieb unverändert schlecht, die Menge der gebundenen Substanzen war allerdings nach dieser Reinigung des Urins um den Faktor 10 vermindert.

Weiterhin wurde festgestellt, daß Fraktion I von extrahiertem Humanurin sowie Fraktion II eines mit Aktivkohle vorbehandelten Humanurins (wobei 95 % von zugegebenen ^3H -PGE₂ adsorbiert wurde) ebenfalls ohne vorherige Konversion mit dem PGB-Antikörper reagierten (Abb. 11).

Insgesamt zeigen diese Versuche, daß im Humanurin Substanzen vorhanden sind, die an der LH-20-Sephadexsäule sowie an der Kieselgelsäule gleiches chromatographisches Verhalten wie die klassischen PG's zeigen und mit dem PGB-Antikörper kreuzreagieren.

4 Vergleich verschiedener Konversionsreaktionen von PGE₂ zu PGB₂

Für die Konversion von PGE zu PGB, die für die Messung von Urin-PGE im PGB-Radioimmunoassay notwendig ist, sind mehrere Methoden bekannt (128). Hier wurden folgende Konversionsreaktionen untersucht:

Inkubation der PGE-Proben in:

- a) 0.1 ml 0.1 n-NaOH (pH=13), 5 Min. bei 100° C
- b) wie bei a), aber Inkubation für 30 Min. bei 37° C
- c) 1 ml 1N-KOH in Methanol und Inkubation für 30 Min. bei 37° C

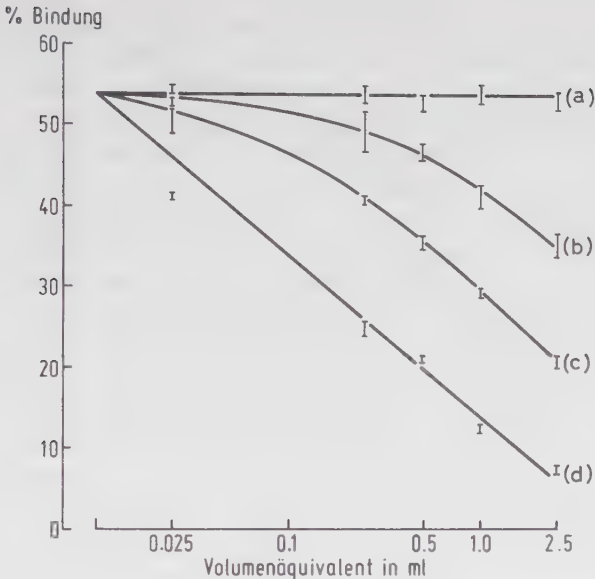


Abb. 11

Bindung (Ordinate) verschiedener Mengen extrahierten und an der Kieselgelsäule chromatographisch getrennten Humanurins, bzw. Puffers (Abszisse) an den PGB_2 -Antikörper ohne Konversion

- a Fraktion II (Puffer extrahiert)
- b Fraktion II (mit Aktivkohle vorbehandelter Humanurin)
- c Fraktion I (Humanurin)
- d Fraktion II (Humanurin)

Nach Reaktion a und b konnten die Proben nach Verdünnung mit dem RIA-Puffer und Kontrolle des pH-Wertes direkt in den Radioimmunoassay überführt werden. Reaktion c machte eine vorherige Extraktion erforderlich (siehe S. 39).

Zur Prüfung der drei Konversionsreaktionen wurden äthanolische PGE_2 -Lösungen (0.01 mg/ml), die bei -20°C gelagert waren, durch N_2 -Begasung getrocknet und nach Reaktion a, b oder c jeweils in PGB_2 überführt; aus den erhaltenen PGB_2 -Lösungen wurden durch stufenweise Verdünnung mit RIA-Puffer Eichlösungen hergestellt und im PGB_2 -RIA gemessen. Dabei ergab sich, daß die durch Reaktion a bis c erhaltenen PGB_2 -Eichkurven alle auf der mit authentischem PGB_2 erstellten Eichkurve lagen (Abb. 12). Wurden jedoch extrahierte und in Fraktion II erhaltene Human- oder Kaninchenurine zusammen mit den PGE_2 -Lösungen konvertiert, so waren die mittels NaOH (Reaktion a und b) erhaltenen PGB_2 -Eichkurven nach rechts verschoben (Abb. 13); dies bedeutet, daß das erhaltene PGB_2 geringer immunoreaktiv war. Bei der Konversion von PGE_2 mit methanolischer KOH in Anwesenheit der in Fraktion II erhaltenen Urine war dagegen keine Verschiebung gegenüber der mit PGB_2 erstellten Eichkurve festzustellen.

Die Größe der Verschiebung der Eichkurven bei Konversion mit NaOH war unabhängig von der Menge der bei der Reaktion anwesenden Urine und betrug den Faktor $F=4-5$. Der gleiche Faktor wurde beim Vergleich von biologischen und radioimmunologischen PGE -Messungen von Kaninchenurinen gefunden, wenn für die radioimmunologische Messung die Konversion zu PGB mit NaOH durchgeführt wurde (Tab. 2). Um auszuschließen, daß PGE durch NaOH bei Anwesenheit der extrahierten und in Fraktion II erhaltenen Urine nur unvollständig in PGB konvertiert wurde (was eine mögliche Ursache für die geringere Immunoreaktivität wäre) wurden $^3\text{H-PGE}_1$, PGE_2 und in Fraktion II erhaltener Urin zusammen in NaOH ($\text{pH}=13$) 5 Min. bei 100°C inkubiert und die Vollständigkeit der Konversion mit Hilfe von Dünnschichtchromatographie und Dünnschichtscanner überprüft. Es ergab sich jedoch kein Unterschied zu dem authentischen PGB_2 bzw. $^3\text{H-PGB}_2$.

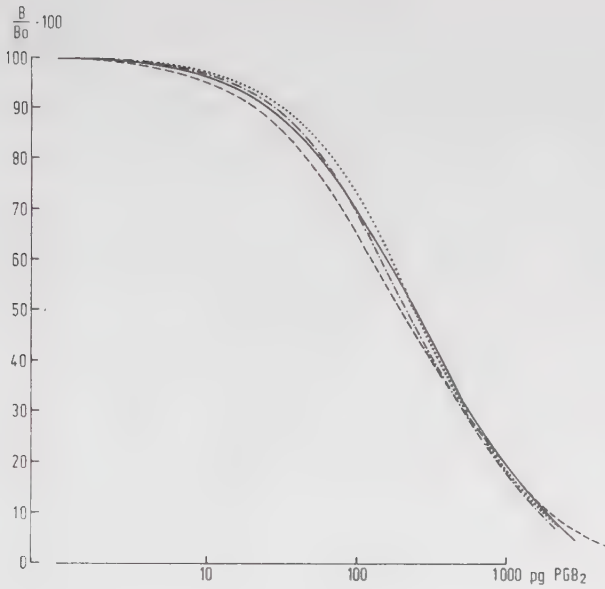


Abb. 12

Nach verschiedenen Konversionsmethoden erhaltene
 PGB_2 -Eichkurven

- Authentisches PGB_2
- PGE_2 nach Konversion in methanolischer KOH ($37^\circ C$)
- .-.-.- PGE_2 nach Konversion in NaOH ($37^\circ C$)
- PGE_2 nach Konversion in NaOH ($100^\circ C$)

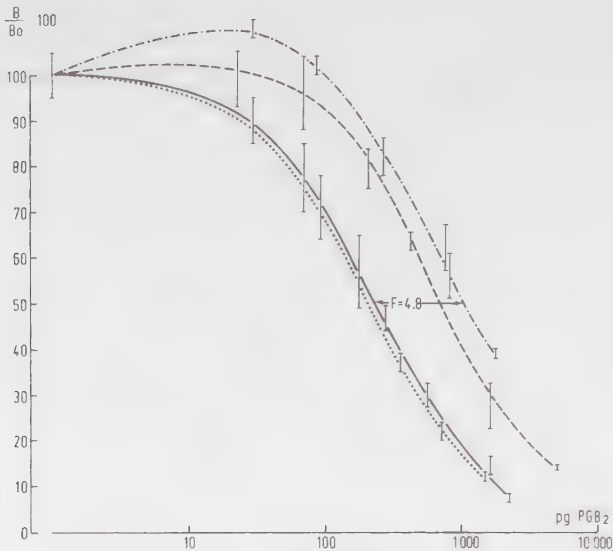


Abb. 13

Nach verschiedenen Konversionsmethoden erhaltene PGE_2 -Eichkurven. Bei der Konversionsreaktion Zusatz von extrahiertem und in Fraktion II erhaltenem Urin.

- Authentisches PGB_2
- PGE_2 nach Konversion in methanolischer KOH ($37^\circ C$)
- . - . - . PGE_2 nach Konversion in NaOH ($37^\circ C$)
- PGE_2 nach Konversion in NaOH ($100^\circ C$)

Tabelle 2: Vergleich von PGE-Analysen im Kaninchenurin: Messung im Bioassay als PGE₂ und im Radioimmunoassay als PGB₂; Konversion zu PGB₂ in NaOH (pH=13) 30 Min. bei 37° C.

Urinproben (15 ml)	PGB ₂ in ng im ² RIA	PGE ₂ in ng im Bioassay	$F = \frac{PGE_2}{PGB_2}$
1	5,9	28	4,7
2	37,6	196	5,2
3	24,4	98	4,0
4	4,8	20	4,1
5	36,1	150	4,2
			MW : 4,4

(γ) Vergleich von Radioimmunoassay und Bioassay für die PGE-Analyse im Kaninchenurin

Für einen methodischen Vergleich von Radioimmunoassay und Bioassay wurden 100 verschiedene Kaninchenurine (24-h-Sammelurine und in Akut-Versuchen gewonnene Ureterurine) extrahiert, chromatographisch getrennt und die PGE-enthaltende Fraktion II eingedampft und in Essigsäureäthylester gelöst. Die Proben wurden parallel in verschiedenen RIA-Ansätzen und in verschiedenen Messungen am rat fundus strip bestimmt, wobei jeweils 4 % der Proben für die Messung der Recovery, 4 % für die radioimmunologische Bestimmung und 92 % für die biologische Messung verwendet wurden. Die RIA-Proben wurden nach N₂-Trocknung des Essigsäureäthylesters in methanolischer KOH zu PGB konvertiert, extrahiert und in RIA-Puffer gelöst. Der pH-Wert wurde mittels pH-Papier kontrolliert. Da die Eichkurve mit solvent residue (Reste der metha-

nolischen KOH und der Ameisensäure) gegenüber der ohne solvent residue gering verschoben war (Abb. 14), wurden für jeden Radioimmunoassay parallel den Proben Leerwerte in 1M KOH in Methanol konvertiert, extrahiert und in RIA-luffer gelöst. Dieser wurde dann für die Eichkurve verwendet.

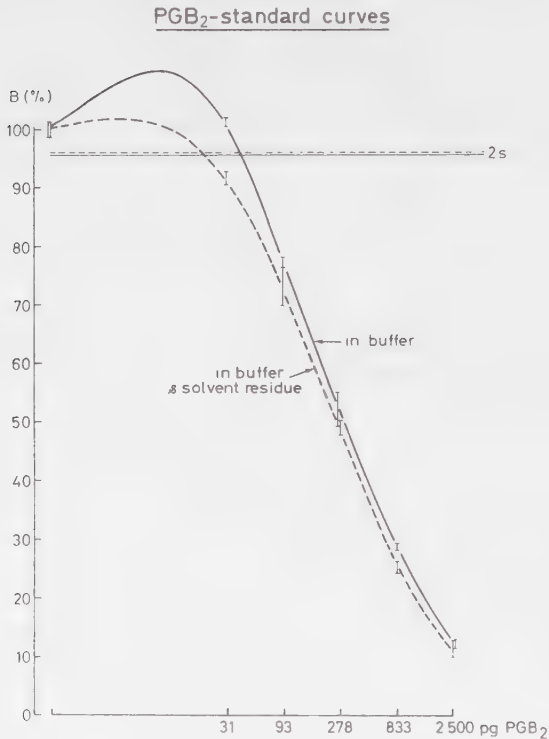


Abb. 14

Einfluß von solvent residue auf die PGB₂-Eichkurve

B Ergebnisse der PGE-Analyse im Urin

a) Extraktion und chromatographische Trennung

Die Bestimmung der PGE-Konzentrationen von Kaninchen- oder Humanurin im Bioassay oder Radioimmunoassay erfolgte nach Extraktion und säulenchromatographischer Trennung der biologischen Proben, um durch die gruppenspezifische Auftrennung der PG's qualitativ und quantitativ reproduzierbare Bestimmungen des Urin-PGE's zu gewährleisten. Die Messung der Recovery durch Zugabe von $^3\text{H-PGE}_1$ oder $^3\text{H-PGE}_2$ zu jeder Urinprobe vor der Extraktion erfaßte den durch Extraktion und chromatographische Trennung bedingten, jeweils unterschiedlichen PGE-Verlust. Die Recovery betrug $56 \pm 13 \%$ (SD, n=200) und war unabhängig sowohl von der Größe des extrahierten Urinvolumens als auch vom Urin-pH, der zwischen 5,5 - 8 lag. Kleinere pH-Schwankungen (bis 0,5) bei der Ansäuerung des Urins vor der Extraktion waren ebenfalls ohne Einfluß auf die Recovery.

b) Biologische PGE-Analyse

Als PGE-Bestimmungsmethode wurde vorwiegend der Bioassay am rat fundus strip und zwar in der großen Analysenkammer verwendet. Für PGE-Messungen im Kaninchenurin ist die damit erzielbare Empfindlichkeit (10 ng PGE_2) ausreichend. Für PGE-Messungen im Humanurin wurde der geringeren PGE-Konzentration wegen eine 10-fach kleinere Analysenkammer benutzt, so daß die Empfindlichkeit des Bioassays entsprechend vergrößert war: die untere Nachweisgrenze von PGE_2 betrug hier 1 ng . Der verwendete Bioassay ist relativ spezifisch für PGE, wobei PGE_1 und PGE_2 gleiche Kontraktionsaktivitäten besitzen und daher nicht unterschieden werden können.

Bei 20 Bastard-Kaninchen wurde die pro 24 h ausgeschiedene PGE-Menge teilweise über einen Zeitraum von 2 Wochen gemessen. Sie betrug zwischen 200 und 3000 ng. Der Durchschnittswert der 24 h-PGE-Ausscheidung, die über eine 4-tägige Kontrollperiode pro Kaninchen ermittelt wurde, betrug: 1836 ± 247 ng (SE). Die mittlere PGE-Konzentration der 24h-Sammelurine war: 12.3 ± 1.6 ng/ml (SE). Es ergab sich keine individuelle Korrelation der ausgeschiedenen PGE-Menge zum Urin-pH. Auch konnte unter diesen Normalbedingungen keine Korrelation von ausgeschiedener PGE-Menge zum Urinvolumen oder zur Natriumausscheidung gefunden werden, wie die Verlaufskurven von 2 Kontrolltieren (shamoperierten Kaninchen) in typischer Weise zeigen (Abb.22).

Weiterhin wurde in Akutversuchen an Kaninchen (n=5), die mit Urethan narkotisiert waren, während einer Kontrollperiode von 1 1/2 h die im Ureterurin pro 30 Min. ausgeschiedene mittlere PGE-Menge bestimmt; sie betrug pro Tier: 280 ± 78 ng (SE), umgerechnet pro 24 h: 13440 ± 3744 ng (SE). Die mittlere PGE-Konzentration im Ureterurin war 147 ± 54 ng/ml (SE). Die unter diesen Voraussetzungen im Ureterurin ausgeschiedene PGE-Menge sowie PGE-Konzentration war damit größer als die entsprechenden Werte, die von den unnarkotisierten und unoperierten Kaninchen im 24h-Urin erhalten wurden ($p < 0,005$).

Bei der Messung von PGE im Humanurin wurden von 20 - 25-jährigen gesunden Probanden die PGE-Konzentrationen bestimmt (Tab. 3). Die Urine wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen als Mittelstrahlurin morgens gesammelt; die gemessenen Werte liegen im Bereich von 50 - 500 pg/ml.

Tabelle 3: Biologische PGE-Bestimmung im Humanurin;
PGE in pg/ml (m = männlich, w = weiblich)

	w	w	m	m	m
1. Tag	55	158	210	50	93
2. Tag	21	95	507	37	69

c) Radioimmunologische PGE-Analyse

Da der Antikörper des verwendeten Radioimmunoassays GB-spezifisch ist, mußte das nach der Aufarbeitung erhaltene Urin-PGE in PGB überführt werden. Die Konversion von PGE zu PGB eröffnet dabei die Möglichkeit, die Spezifität der radioimmunologischen Bestimmung von Urin-PGE zu überprüfen, da wegen der sehr geringen Kreuzreaktion des PGB-Antikörpers mit PGE ($< 1\%$) Fraktion II der extrahierten Urine ohne Konversion zu PGB nicht mit dem Antikörper reagieren darf.

Für die Bestimmung von PGE im Humanurin stellte sich der verwendete Radioimmunoassay wegen der hohen Kreuzreaktion des PGB-Antikörpers mit im Humanurin vorhandenen bislang nicht näher definierten Substanzen als unbrauchbar heraus. Versuche, die interferierenden, kreuzreagierenden Substanzen mit Hilfe verschiedener chromatographischer Verfahren und Extraktionsmethoden abzutrennen, blieben erfolglos. Die kreuzreagierenden Substanzen waren nicht nur in Fraktion II, sondern auch in Fraktion I vorhanden. Das Ausmaß der Kreuzreaktion hing von der Aufarbeitung der Urine ab: die Bindung des Antikörpers an die kreuzreagierenden Substanzen, allerdings auch die an konvertiertes Urin-PGE war bei größerer Reinigung der Urine geringer.

Im Gegensatz dazu gelang es, für die Bestimmung von PGE im Kaninchenurin einen sensitiven und spezifischen PGB-Radioimmunoassay aufzubauen. Eine Kreuzreaktion mit in Fraktion II vorhandenen Substanzen des extrahierten Kaninchenurins war erst bei größerer Menge der eingesetzten Urinproben nachweisbar; für die zur PGE-Messung benötigte Menge (< 0.3 ml Urinvolumen) war die Kreuzreaktion jedoch unterhalb der Nachweisgrenze des RIA's (Abb. 9).

Erstmals konnte für die Analyse von Urin-PGE eine Korrelation zwischen radioimmunologisch (als PGB_2) und biologisch (als PGE_2) gemessenen Werten aufgestellt werden: aus PGE-Analysen von 100 verschiedenen Kaninchenurinen, wobei sowohl 24h-Sammelurine als auch Ureterurine verwendet wurden, ergab sich eine Regressionsgerade mit der Gleichung $y = 4.9 + 0.84x$ und dem Korrelationskoeffizienten $r = 0.936$. Diese Regressionsgerade ist von der Identitätsgeraden $y = x$ nicht signifikant unterschieden ($p > 0.05$, Abb. 15).

C Diskussion zur PGE-Analyse im Urin

Die Extraktion und chromatographische Auftrennung der Urine vor der PGE-Analyse im Bioassay und Radioimmunoassay war für die Spezifität der Messung notwendig. Bei der PGE-Messung im Bioassay sollten dadurch andere am rat fundus strip aktive Substanzen eliminiert werden. Außer evtl. biologisch aktiven wasserlöslichen Substanzen im Urin gehören hierzu noch weitere im Urin vorhandene PG's wie $\text{PGF}_{2\alpha}$, das etwa 1/10 der Aktivität von PGE_2 am rat fundus strip besitzt (105), sowie möglicherweise auch PG-Urinmetabolite. So dürften die im Humanurin nachgewiesenen Haupturinmetabolite von PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ auf Grund ihrer 15-keto-13, 14-dihydro-

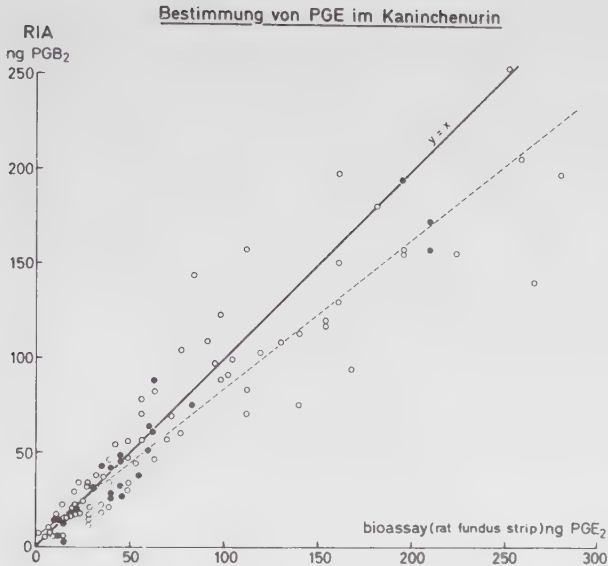


Abb. 15

Korrelation von radioimmunologischer und biologischer
PGE-Messung im Kaninchenurin

○ ○ ○ ○ ○ 24 h-Urine

● ● ● ● ● Ureterurine

Regressionsgerade: $y = 4.9 + 0.84x$

Korrelationskoeffizient: $r = 0.94$;

$p > 0.05$ gegenüber $y=x$

Struktur eine ähnlich geringe Kontraktionsaktivität wie der Plasmametabolit 15-keto-13, 14-dihydro-PGE besitzen, dessen Kontraktionsaktivität am rat fundus strip 1/100 der von PGE beträgt (19); durch die im Verhältnis zu den primären Urin-PG's vergleichsweise viel größere Konzentration dieser Haupturinmetabolite von

PGE und PGF (ca. 100-fach größer im Humanurin (11)), könnten sie jedoch mit der PGE-Messung am rat fundus strip erheblich interferieren: die Abtrennung dieser PG-Urinmetabolite, die noch polarere Eigenschaften als PGF besitzen und daher von der Kieselgelsäule nach PGF eluiert werden, verhinderte unerwünschte Fehlmessungen. Ebenfalls erscheint eine Abtrennung von Arachidonsäure, die in der ersten unpolaren Fraktion eluiert wird, wichtig, da diese durch Synthese im rat fundus strip zu PGE biologisch wirksam werden kann, allerdings erst in 1000-fach höherer Konzentration als PGE (105). Die Spezifität des im Kaninchen- oder Humanurin biologisch gemessenen PGE konnte zwar nicht direkt nachgeprüft werden, es kann aber auf Untersuchungen verwiesen werden, in denen die Urine in der gleichen Weise aufgearbeitet wurden und die PGE-induzierten Kontraktionen der Urinproben am rat fundus strip entweder durch Zugabe des PG-inaktivierenden Enzyms PGDH oder des PG-Rezeptorantagonisten SC-19220 aufgehoben werden konnten (58, 29).

Da die biologische Messung von PGE am rat fundus strip sehr zeitaufwendig und daher für die Messung einer großen Probenzahl nicht praktikabel ist, außerdem mit ziemlicher Meßungenauigkeit ($\pm 20,4\%$) behaftet ist, wurde als weitere Methode zur Messung von PGE im Urin eine radioimmunologische Bestimmung entwickelt. Diese bietet außer der Möglichkeit, den PGE-Gehalt einer großen Probenanzahl in einem Arbeitsgang messen zu können (30 Urinproben pro Radioimmunoassay bei Bestimmung von 3-fach-Werten) als Vorteile eine größere Empfindlichkeit und Genauigkeit der Messung. Die Problematik der radioimmunologischen PGE-Bestimmung jedoch liegt generell in der fraglichen Spezifität der Messung, die einerseits von der Qualität des Antikörpers, andererseits von der Art und Zusammensetzung der zu messenden biologischen Proben abhängig ist. Aus diesem Grunde ist

die Voraussetzung für eine radioimmunologische PGE-Bestimmung die Prüfung der Spezifität. Diese ist besonders bei PG-Bestimmungen im Urin wichtig, da dieser nicht nur renale PG's und PG-Metabolite enthält, sondern den Hauptausscheidungsweg von im Körper anfallenden Produkten des PG-Metabolismus darstellt (85).

Die Prüfung der Spezifität geschieht am besten durch Korrelation der radioimmunologischen Bestimmung mit anderen spezifischen Bestimmungsmethoden. Durch die Verwendung von PGE-Antikörpern zur PGE-Messung und der dadurch erforderlichen Konversion der PGE-Fraktionen der extrahierten Urine zu PGB war in den vorliegenden Untersuchungen zusätzlich eine Möglichkeit gegeben, die Spezifität der radioimmunologischen Bestimmung zu überprüfen, da zu fordern ist, daß nur zu PGB konvertierte, nicht aber unkonvertierte Urin-PGE-Fraktionen eine Bindung mit dem PGB-Antikörper eingehen. Diese "indirekte" radioimmunologische Bestimmung von Urin-PGE mittels PGB-Antikörper ist in diesem Punkt sogar der direkten Bestimmung durch PGE-Antikörper überlegen, da es für letztere wegen des Fehlens eines speziell PGE-freien Urins ("blank") keine Kontrollmöglichkeit gibt. Die anhand dieser Konversionsreaktion erfolgte Prüfung der Spezifität fiel für die radioimmunologische PGE-Bestimmung von Kaninchenurin und Humanurin sehr unterschiedlich aus: im Humanurin sind - im Unterschied zu Kaninchenurin - im beträchtlichen Maße mit dem PGB-Antikörper kreuzreagierende Substanzen vorhanden. Bei der Frage nach der Art dieser kreuzreagierenden Substanzen im Humanurin sind insbesondere die Beobachtungen wichtig, daß diese vorwiegend in den beiden ersten Fraktionen von der Kieselgelsäule eluiert wurden, und daß sie sich auch nach Zugabe von Aktivkohle zum Urin nicht entfernen ließen. Weiterhin war nach intensiverer Reinigung der Urine die Kreuzreaktion quantitativ viel geringer als nach der an Hand markier-

ter PGE's ermittelten Recovery zu erwarten wäre. Diese Beobachtungen lassen den Schluß zu, daß die Kreuzreaktion eher auf quantitativ reiches Vorkommen dieser Substanzen im Humanurin als auf Strukturähnlichkeiten mit PGB zurückzuführen ist. Es könnten entweder unspezifische im Urin vorhandene Lipide (z.B. Steroide) oder aber PG-Metabolite, die im Humanurin in quantitativ bedeutender Menge vorhanden sind, für die Kreuzreaktion verantwortlich sein. Allerdings dürften die bisher beschriebenen hauptsächlich PG-Metabolite im Humanurin, gaschromatographisch insgesamt als Tetranorprostanedioat bestimmt (85), wegen ihrer größeren Polarität auf Grund von 2 Carboxyl-Gruppen und daher späteren Elution an der Kieselgelsäule für diese Kreuzreaktion nur teilweise in Betracht zu ziehen sein. Es wären daher als Erklärung für die Kreuzreaktion noch andere, bisher nicht bekannte PG-Metabolite anzunehmen. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, daß nach Infusionen von markierter Arachidonsäure in die Nierenarterie von Hunden die im Urin ausgeschiedene Aktivität nur zu einem kleinen Teil in der PGE- bzw. PGF-Fraktion der Kieselgelsäule - die renale PG-Synthese widerspiegelnd - wiederzufinden ist. Der größere Teil ist in den unpolaren vor PGE und PGF eluierten Fraktionen vorhanden, wobei davon jedoch nur ein geringer Teil der nicht metabolisierten Arachidonsäure zukommt (32). Diese innerhalb der Niere aus Arachidonsäure gebildeten, in ihrer Polarität zwischen Arachidonsäure und PGE einzuordnenden und bisher noch unbekannten PG-ähnlichen Substanzen könnten teilweise für die Kreuzreaktion des PGB-Antikörpers mit in Fraktion I vorhandenen Substanzen verantwortlich sein. Insgesamt sind also die Antworten auf die Frage nach der Art der mit dem PGB-Antikörper kreuzreagierenden Substanzen im Humanurin weitgehend spekulativ. Noch weniger ist die Ursache für die nur minimale, im Meßbereich unterhalb der Nachweis-

grenze liegende Kreuzreaktion des PGB-Antikörpers mit Substanzen aus Kaninchenurin zu erklären, da über die PG-Metabolitausscheidung im Urin bei Kaninchen bisher kaum Daten bekannt sind. Immerhin sind hier nach i.v. Injektion von ^3H - $\text{PGF}_{2\alpha}$ 6 Urinmetabolite von $\text{PGF}_{2\alpha}$ identifiziert worden, worunter sich zwei bisher bei anderen Species nicht beschriebene Metabolite fanden (111). Die unterschiedliche Kreuzreaktion des PGB-Antikörpers mit Humanurin und Kaninchenurin könnte somit auf Unterschiede qualitativer und quantitativer Art in der PG-Urinmetabolitausscheidung zurückgeführt werden, wie sie bereits bei anderen Species (Ratte, Meerschweinchen, Mensch) gefunden wurden (Lit.: 85). Weiterhin sind die unterschiedlichen PGE-Konzentrationen von Kaninchenurin und Humanurin bemerkenswert. Eine unterschiedliche Relation von PGE-Konzentration zu PG-Metabolitkonzentration, die bei Kaninchenurin eher groß, bei Humanurin eher klein wäre, könnte ebenfalls für das unterschiedliche Bindungsverhalten von Humanurin und Kaninchenurin gegenüber dem PGB-Antikörper verantwortlich sein.

Während der Radioimmunoassay für die PGE-Bestimmung im Humanurin sich daher als unbrauchbar herausstellte, wurde der Radioimmunoassay für die PGE-Bestimmung im Kaninchenurin mit dem Bioassay am rat fundus strip verglichen. Dabei konnte für die PGE-Bestimmung im Urin erstmals eine Korrelation einer radioimmunologischen Methode mit einer biologischen Bestimmungsmethode aufgestellt werden. Die Korrelation war hochsignifikant ($r=0.94$). Auf Grund dieser guten Korrelation von biologisch und radioimmunologisch bestimmten Werten von PGE in 100 verschiedenen Kaninchenurinen ist die Spezifität der radioimmunologischen Bestimmung gesichert und daher die RIA-Methode für die Analyse von PGE im Kaninchenurin sehr gut geeignet, da sie gegenüber anderen Bestimmungsmethoden, wie oben erwähnt,

erhebliche Vorteile besitzt.

Für die radioimmunologische PGE-Bestimmung im Kaninchenurin anhand von PGB-Antikörpern war wichtig, welche Methode für die Konversion von PGE zu PGB verwendet wurde. Warum das aus PGE entstehende Produkt bei Konversion in wässriger NaOH in Anwesenheit von extrahierten und in Fraktion II erhaltenen Urinen ca. 1/4 geringer immunoreaktiv als bei Konversion in methanolischer KOH war, ist unklar. Bei gleicher Inkubationszeit und Temperatur liegt der Unterschied vor allem im Reaktionsmedium (Methanol bzw. H_2O). Dieser Unterschied spielt jedoch nur eine Rolle, wenn extrahierter Urin bei der Konversion anwesend ist. Da die bei Konversion mit NaOH in Anwesenheit von extrahiertem Urin entstehenden Produkte jedoch dünnschichtchromatographisch nicht von PGB unterschieden sind, dürften diese Produkte ebenfalls eine Dehydratation am Zyklopentanring, dessen Polarität für das chromatographische Verhalten entscheidend ist, erfahren. Die im Vergleich zu PGB veränderte Immunoreaktivität dieser Produkte könnte auf Reduktionen von Doppelbindungen in der Seitenkette, die durch die Mitinkubation von extrahiertem Urin in wässriger NaOH - nicht aber in methanolischer KOH - ermöglicht würden, zurückzuführen sein. In diesem Zusammenhang wurde ein von PGB verschiedenes Reaktionsprodukt beschrieben, das man bei Inkubation von PGE in meth. KOH bei $100^{\circ}C$ (5 Min.) erhielt und dessen gegenüber PGB verändertes UV-Absorptionsspektrum auf eine Reduktion der Doppelbindung bei $C_{13/14}$ zurückgeführt wurde (128).

Wegen der generellen Schwierigkeit der PGE-Analyse im Urin sind für die gemessenen Normalwerte im Kaninchen- und Humanurin nur vereinzelt Vergleichsdaten aus der Literatur vorhanden. Die biologisch gemessenen PGE-Konzentrationen im Humanurin (S. 52) liegen etwas niedriger als die von Fröhlich et al bei Frauen mittels

Gaschromatographie-Massenspektrometrie bzw. Plasmamembran-Receptorassay bestimmten Werte (374 bzw. 319 pg/ml, 32).

Die bei Akutversuchen an narkotisierten Kaninchen im Ureterurin gemessenen PGE-Konzentrationen stimmen mit den unter ähnlichen experimentellen Bedingungen (Urethan-Narkose) von Larsson et al mittels Bioassay am rat fundus strip gemessenen Werten überein (58). Für die im 24h-Urin gemessene tägliche PGE-Ausscheidung von Kaninchen existieren bisher keine Vergleichsdaten. Bemerkenswert ist die geringere PGE-Ausscheidung und Konzentration der 24h-Urine gegenüber der der Ureterurine; prinzipiell gäbe es dafür folgende Erklärungsmöglichkeiten:

- (1) das PGE des Ureterurins wird während der weiteren Passage durch die ableitenden Harnwege, vor allem in der Blase teilweise inaktiviert.
- (2) Die höhere PGE-Konzentration des Ureterurins ist auf eine durch experimentelle Bedingungen im akuten Tierversuch (Narkose, chirurgische Manipulationen im Abdomen) bedingte erhöhte renale PG-Synthese zurückzuführen.

Über eine Inaktivierung von PGE in den ableitenden Harnwegen ist bisher nichts bekannt. Für die zweite Erklärungsmöglichkeit spricht folgendes: bei Kaninchen, die eine generelle Anästhesie mit Pentobarbital erhalten hatten und deren Nierengefäße zur Messung des RBF katheterisiert worden waren, wurde nach 1h eine Reduktion des RBF gegenüber dem initial gemessenen Wert festgestellt; nach 2,3 und 4 h war der RBF nicht weiter reduziert (67). Da eine Reduktion des RBF durch renale Vasokonstriktion, gleichgültig ob über eine Erhöhung des Sympathikotonus, Aktivierung anderer Pressorsysteme oder durch das Narkosemittel selbst ausgelöst, einen Stimulus für die renale PG-Synthese

darstellt (Lit.: 127), könnte die in unseren Versuchen erhöhte PG-Konzentration im Ureterurin auf eine eingeschränkte renale Perfusion zurückzuführen sein. Inwieweit jedoch die Narkose in unseren Experimenten für eine Einschränkung des RBF verantwortlich ist, ist fraglich, da Urethan verwendet wurde, von dem berichtet wird, daß es im Unterschied zu Pentobarbital den RBF gegenüber unnarkotisierten Kaninchen nicht senkt (119). Die Ursache eines eingeschränkten RBF in unseren Versuchen wäre daher eher in den operativen Eingriffen an und im Abdomen (Medianschnitt etc.) zu suchen, die angeblich die renale Funktion besonders stark beeinträchtigen (48). Die in unseren Versuchen bei einigen Kaninchen am Anfang der Kontrollperiode, d. h. nach der Präparation, beobachtete besonders hohe PGE-Ausscheidung und niedrige UV-Ausscheidung könnte darauf zurückzuführen sein; die bei diesen Kaninchen anschließend erfolgende Abnahme der PGE-Ausscheidung während der Kontrollperiode wäre dann als Antwort auf eine zunehmende Stabilisierung des RBF und der Nierenfunktion aufzufassen.

Als weitere Unterstützung für die Annahme, daß unter den Bedingungen des akuten Tierversuchs vermehrt PG's freigesetzt werden, sind die quantitativen Unterschiede des juxtamedullären Blutflusses bei anästhesierten und wachen Hunden, sowie die bei anästhesierten Hunden, nicht aber bei wachen Hunden erfolgende Reduktion des RBF nach PG-Synthesehemmung durch Indomethacin anzuführen: bei anästhesierten Hunden, bei denen der innerkortikale RBF relativ erhöht ist, wird der RBF nach Indomethacin-Applikation reduziert, nicht aber bei wachen Hunden, bei denen der juxtamedulläre Blutfluß relativ niedrig ist, so daß dessen weitere Reduktion den RBF meßbar nicht weiter beeinträchtigt (127). Diese Beobachtungen stehen mit einer bei anästhesierten Tieren erhöhten renalen PG-Synthese in Übereinstimmung.

Während die besonders große Streuung der PGE-Ausscheidung bei den Akutversuchen sicherlich auf eine durch die experimentellen Umstände bedingte Instabilität der Nierendurchblutung und Nierenfunktion zurückzuführen ist, ist der Grund für die zwar kleinere, aber immer noch beträchtliche inter- und intraindividuelle Streuung der PGE-Ausscheidung im 24h-Urin bei normalen Bastardkaninchen unklar.

Da weder zum Urinvolumen, noch zur Na- oder K-Ausscheidung Korrelationen zur PGE-Ausscheidung gefunden werden konnten, ist nach weiteren Möglichkeiten zu suchen, die für diese "physiologischen" Schwankungen der täglichen PGE-Ausscheidung verantwortlich sein könnten.

IV Uninephrektomie an Kaninchen:

PGE- und Elektrolytausscheidung und Urinvolumen der verbleibenden Niere

A Methodik der Uninephrektomieversuche

a) Chronische Versuche

Bastard-Kaninchen, die zur Gewinnung von 24h-Sammelurinen in Stoffwechselkäfige gesetzt wurden, erhielten Standardfutter (Altromin) und Wasser ad libitum. Nach einem Adaptationszeitraum für die Kaninchen von 2 - 3 Tagen in den Stoffwechselkäfigen wurde mit einer 4-tägigen Kontrollperiode begonnen; anschließend wurden die Kaninchen entweder uninephrektomiert oder shamoperiert und für eine weitere Sammelperiode von 8 Tagen in den Stoffwechselkäfigen gehalten. 5 Wochen später wurden bei einem Teil der uninephrektomierten Kaninchen nochmals für 4 Tage 24h-Urine gesammelt. Insgesamt wurden 3 Gruppen untersucht:

- (a) shamoperierte Kaninchen (n=5),
- (b) uninephrektomierte Kaninchen (n=9) und
- (c) uninephrektomierte Kaninchen, die 1h vor der Uninephrektomie und an den 3 folgenden postoperativen Tagen Indomethacin (15 mg/kg/24h) zur Hemmung der Prostaglandinsynthese erhalten hatten (n=6, "Uninephrektomie-Indomethacingruppe")

Die Uninephrektomie bzw. Shamoperation wurde folgendermaßen durchgeführt: die Kaninchen wurden mit Pentobarbital i.v. (Nembutal^R 30-45 mg/kg) narkotisiert. Über einen ventralen Medianschnitt

wurden unter halbsterilen Bedingungen transperitoneal die Gefäße der rechten Niere freigelegt; entweder wurde an dem Gefäßstiel und der Nierenloge nur etwas manipuliert (Shamoperation) oder es wurde nach Abbinden der Nierengefäße und des Ureters die Niere ektomiert. Nach Reponierung der Darmschlingen wurde die Operationswunde in 3 Schichten verschlossen.

Die Uninephrektomie-Indomethacin-Gruppe erhielt 1h vor der Nephrektomie Indomethacin (15 mg/kg) entweder intraperitoneal (10 mg/ml in Phosphatpuffer, pH 8, frisch angesetzt und keimfrei über einen Mikrofilter aufbereitet) oder intragastral über einen Magenschlauch (Amuno^R-Suspension 5 mg/ml). Die Indomethacingabe wurde zur Aufrechterhaltung eines Indomethacinspiegels für 4 Tage an den folgenden 3 postoperativen Tagen durch tägliche intraperitoneale Injektionen (15 mg/kg) oder intragastrale Applikationen (wegen der langsamen enteralen Resorption nur 7,5 mg/kg) in Kurznarkose (30 Min.) wiederholt. Zur Kontrolle wurde einigen Kaninchen aus der Gruppe (a) (Nr. 94) und Gruppe (b) (Nr. 85 und 86) in Kurznarkose das Lösungsmittel intraperitoneal injiziert.

Einige Kaninchen der Indomethacingruppe hatten eine gestörte Wundheilung, so daß sie aus dem Experiment ausschieden. Die Störung der Wundheilung war dabei unabhängig von der Applikationsart des Indomethacins: sie trat auch bei intragastraler Indomethacingabe auf und war daher nicht auf lokale Reizungen des Peritoneums durch Indomethacin zurückzuführen.

b) Akutversuche

Zur Erfassung von Frühveränderungen der Ausscheidung von PGE, Na, K im Urin und des Urinvolumens der ver-

bleibenden Niere nach Uninephrektomie wurde von Kaninchen in Narkose über 4 - 5 Stunden Ureterurin in 30 Min.-Portionen gesammelt.

Während der Präparation erhielten die Kaninchen 50 ml isotonische NaCl-Lösung i.v. (60 ml/h) zur Substitution. In Urethan-Narkose (20 %ig, 7 ml/kg) wurde die Trachea kanüliert und der systemische Blutdruck in der a. carotis dextra mit einem strain gauge, Verstärker und Direktschreiber kontinuierlich registriert. Rechter und linker Ureter wurden kurz vor der Einmündung in die Blase katheterisiert. Am Ende der OP wurde die Infusionsmenge auf 25 ml/h reduziert und diese Infusionsgeschwindigkeit bis zum Ende des Experimentes beibehalten. Nach Stabilisierung des Blutdruckes begann die Kontrollperiode mit 3 Urin-Sammelperioden von je 30 Min. aus jeder Niere. Danach wurde die linke Niere nach Verlagerung der Darmschlingen entweder ektomiert (n=5) oder shamoperiert (n=2), und anschließend der Darm wieder reponiert. Während dieser Zeit (15 Min.) wurde kein Urin gesammelt. Anschließend wurden in der experimentellen Periode 4 - 5 Urinportionen aus der rechten bzw. aus beiden Nieren (Shamgruppe) in 30-Min.-Intervallen gesammelt.

c) Auswertung

(α) Chronische Versuche

Als Kontrollperiode dienten die letzten 4 Tage vor Uninephrektomie bzw. Shamoperation: die experimentelle Periode umfaßte die ersten 8 Tage nach Uninephrektomie bzw. Shamoperation. Die aus den 24h-Sammelurinen der einzelnen Kaninchen ermittelten Werte für die tägliche PGE, Na-K-Ausscheidung und für das Urinvolumen wurden jeweils pro Niere berechnet. Falls keine 24-h-Sammelurine erhalten werden konnten, wurden die

in den darauffolgenden 24h erhaltenen Sammelurine analysiert und die erhaltenen Werte pro Tag ausgewertet. Um die verschiedenen Gruppen trotz der individuellen Streuungen gegenüber der Kontrollperiode und untereinander vergleichen zu können, wurde von jedem Kaninchen der individuelle Mittelwert der Kontrollperiode berechnet, dieser gleich 100 % gesetzt und die Werte der experimentellen Periode in % des individuellen Mittelwertes angegeben; aus diesen Werten wurde innerhalb einer Gruppe für jeden Tag der experimentellen Periode der Mittelwert errechnet. Beim Vergleich von experimenteller Periode und Kontrollperiode wurden die Mittelwerte der experimentellen Periode gegenüber dem gleich 100 % gesetzten Mittelwert der Kontrollperiode mit dem gepaarten Student-T-Test auf Signifikanz geprüft. Beim Vergleich der drei Gruppen wurden die in % des individuellen Mittelwertes der Kontrollperiode angegebenen Einzelwerte der experimentellen Periode jeder Gruppe addiert und nach dem Gruppen-T-Test auf Signifikanz geprüft.

Voraussetzung für diese Auswertungsmethode ist die Übereinstimmung der Kontrollwerte der einzelnen Gruppen. Dazu wurde innerhalb jeder Gruppe der absolute Mittelwert aus den Einzelwerten der Kontrollperiode errechnet und mit den anderen Gruppen verglichen. Die Kontrollwerte der verschiedenen Gruppen stimmten im Urinvolumen, der PGE- und K-Ausscheidung überein, nicht jedoch in der Na-Ausscheidung, die bei der Uninephrektomie-Indomethacin-Gruppe viel niedriger war und daher nicht mit der anderer Gruppen verglichen werden konnte (Abb. 16).

(β) Akut-Versuche

Die Kontrollperiode umfaßte 3, die experimentelle Periode 4 - 5 Urin-Sammelperioden von jeweils 30 Min. Die während der Kontrollperiode und bei den shamope-

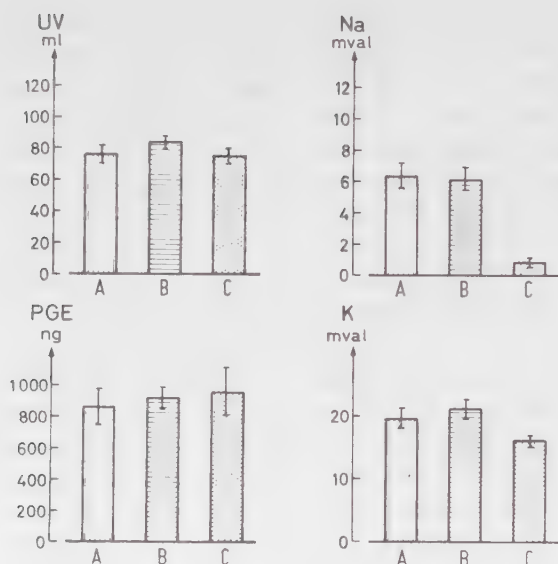


Abb. 16 Mittleres Urinvolumen (UV) und

mittlere PGE-, Na- und K-Ausscheidung in Kaninchenurinen während der Kontrollperiode pro Niere und 24 h (MW $\pm$ SE)

A Kontrollgruppe	n=20
B Uninephrektomiegruppe	n=36
C Uninephrektomie-Indomethacin-Gruppe	n=24

rierten Kaninchen auch während der experimentellen Periode von beiden Ureteren getrennt erhaltenen Urine wurden einzeln analysiert und die erhaltenen Werte bei der Auswertung gemittelt. Die individuellen Werte der letzten (3.) Urinsammelperiode der Kontrollperiode wurden gleich 100 % gesetzt, da der individuelle Mittelwert der gesamten Kontrollperiode für den Vergleich mit der experimentellen Periode nicht

repräsentativ wäre, da während der Kontrollperiode bei einigen Kaninchen die PGE-Ausscheidung und auch die Na-Ausscheidung fortlaufend geringer wurde (Abb.22). Ansonsten wurde analog der Auswertung der chronischen Versuche verfahren.

γ) Bestimmung der Elektrolytkonzentrationen der Urine
Die Urinkonzentrationen von Na und K wurden nach Schütteln und Zentrifugation der aufgetauten Urine und Verdünnung mit Aquabidest (1:40) in einem Eppendorf-Flammenphotometer bestimmt.

B Ergebnisse der Uninephrektomieversuche

a) Chronische Versuche

PGE-Ausscheidung (Abb. 17 und Tab. 4 - 6)

Die PGE-Ausscheidung war während der ersten 24h nach Uninephrektomie gegenüber der Kontrollperiode um 98 % gesteigert ($p < 0.05$), der Anstieg gegenüber den shamoperierten Kaninchen war jedoch wegen der großen Streuung in dieser Gruppe nicht signifikant ($0.05 < p < 0.1$). Ansonsten war während der folgenden 7 Tage gegenüber der Kontrollperiode dieser Gruppe sowie gegenüber den shamoperierten Kaninchen keine erhöhte PGE-Ausscheidung festzustellen. Auch nach 5 Wochen war die bei einigen uninephrektomierten Kaninchen gemessene PGE-Ausscheidung gegenüber der Kontrollperiode nicht erhöht. Kaninchen, die während der ersten 4 Tage nach der Uninephrektomie Indomethacin erhalten hatten, zeigten während dieser Zeit eine gegenüber der Vorperiode um 80 % niedrigere PGE-Ausscheidung, die auch im Vergleich zu den shamoperierten Kaninchen signifikant erniedrigt war ($p < 0.0005$). Nach Absetzen des Indometha-

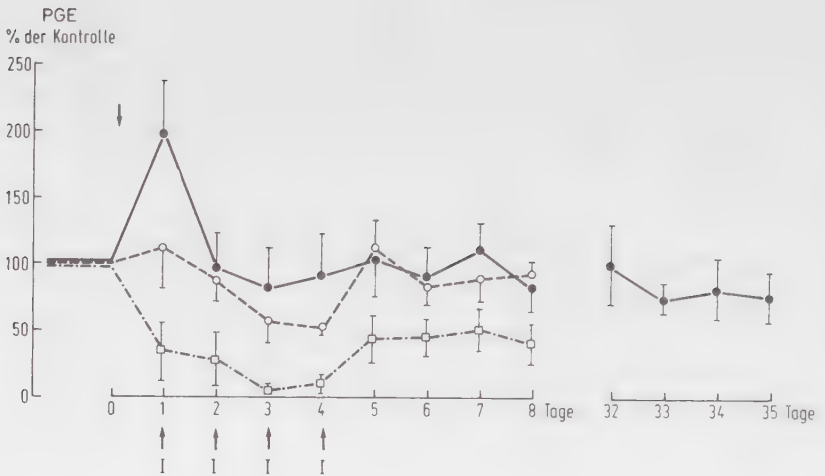


Abb. 17

PGE-Ausscheidung (MW $\pm$ SE)

————— nach Uninephrektomie n=9
 - - - - - nach Sham-Operation n=5
 - . - . - . - . nach Uninephrektomie und Indomethacin (+I) n=6

Abszisse: Tage nach Uninephrektomie bzw. Sham-operation

Ordinate: PGE-Ausscheidung in % der Kontrollperiode (eine Niere)

cins stieg die PGE-Ausscheidung gegenüber der Indomethacinperiode wieder an ($p < 0.01$), blieb jedoch während der folgenden 4 Tage gegenüber den shamoperierten Kaninchen und der Kontrollperiode dieser Gruppe immer noch um 55 % erniedrigt ($p < 0.0005$).

Urinvolumen (Abb. 18 und Tab. 7 - 9)

Am 2. Tag nach Uninephrektomie nahm das Urinvolumen der Restniere im Vergleich zur Kontrollperiode um 85 % zu ($p < 0.05$), blieb während der ersten Woche konstant erhöht und war auch nach einem Monat nicht abgefallen. Bei der Uninephrektomie-Indomethacin-Gruppe

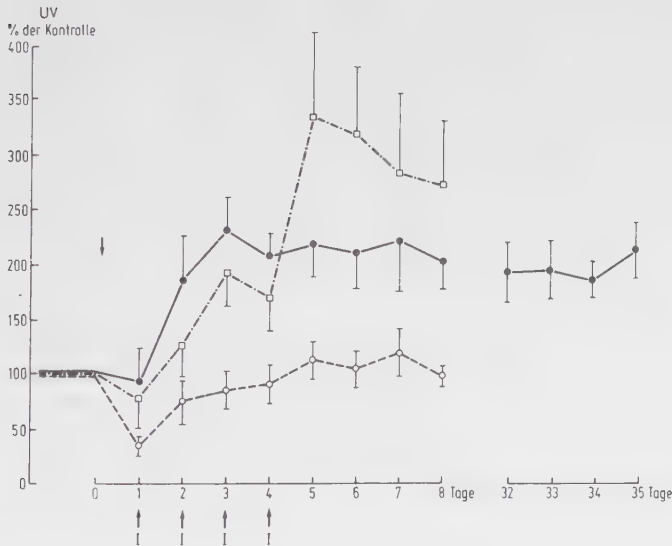


Abb. 18

Urinvolumen (MW ± SE)

- nach Uninephrektomie n=9
- - - - nach Sham-Operation n=5
- . - . - . nach Uninephrektomie und Indomethacin (+I) n=6

Abszisse: Tage nach Uninephrektomie bzw. Sham-Operation

Ordinate: Urinvolumen in % der Kontrollperiode
(eine Niere)

nahm das Urinvolumen im Vergleich zur Kontrollperiode erst am dritten Tag signifikant zu ($p < 0.05$); im Vergleich zu der Uninephrektomie-Gruppe ergaben sich während der ersten 4 Tage nach Uninephrektomie jedoch keine signifikanten Unterschiede. Allerdings stieg in der Uninephrektomie-Indomethacin-Gruppe nach Absetzen des Indomethacins das Urinvolumen vom 4. auf den 5. Tag noch einmal um 155 % (nur Uninephrektomie : 9 %) an und war vom 5. bis 8. Tag auch gegenüber den nur uninephrektomierten Kaninchen signifikant erhöht ($p < 0.01$). Das Urinvolumen der shamoperierten Kaninchen war gegenüber der Kontrollperiode am 1. Tag erniedrigt ($p < 0.0025$), so daß im Vergleich zu dieser Kontrollgruppe das von den beiden anderen uninephrektomierten Gruppen ausgeschiedene Urinvolumen schon am 1. Tag erhöht war ($p < 0.05$).

Na-Ausscheidung (Abb. 19 und Tab. 10, 11)

Wegen der niedrigen Na-Ausscheidung der Uninephrektomie-Indomethacin-Gruppe in der Kontrollperiode konnte diese mit den anderen Gruppen nicht verglichen werden. Die shamoperierten Kaninchen hatten nach der Operation eine gegenüber der Kontrollperiode erniedrigte Na-Ausscheidung, die sich erst am 7. bis 8. postoperativen Tag wieder normalisierte.

Gegenüber dieser Kontrollgruppe war daher die mittlere Na-Ausscheidung der Uninephrektomie-Gruppe schon vom ersten Tag nach Operation an erhöht ($p < 0.01$).

K-Ausscheidung (Abb. 20 und Tab. 12 - 14)

Bei allen Gruppen fiel die K-Ausscheidung gegenüber der Kontrollperiode am 1. Tag durchschnittlich um 70 % ab und nahm dann wieder, bei den einzelnen Gruppen unterschiedlich zu. Gegenüber der Kontrollgruppe war die mittlere K-Ausscheidung der uninephrektomierten Kanin-

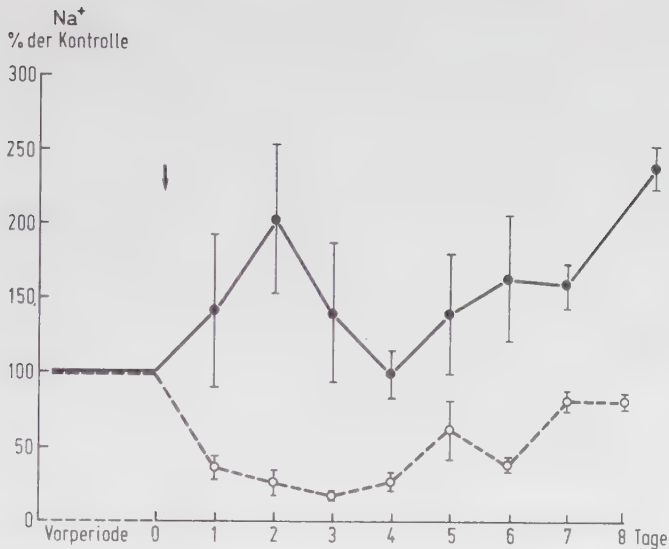


Abb. 19

Na-Ausscheidung (MW ± SE)

———— nach Uninephrektomie n=5
 ----- nach Sham-Operation n=2

Abszisse: Tage nach Uninephrektomie bzw. Sham-Operation

Ordinate: PGE-Ausscheidung in % der Kontrollperiode
 (eine Niere)

chen am 1. - 4. und 5. - 8. Tag erhöht ($p < 0.025$ bzw. $p < 0.0025$). Während bei der Uninephrektomie-Indomethacin-Gruppe die mittlere K-Ausscheidung am 1. - 4. Tag gegenüber der Kontrollgruppe nicht erhöht war, nahm sie nach Absetzen des Indomethacins gegenüber der Kontrollperiode am 5. Tag um 70 % zu und war vom 5. - 8. Tag sogar gegenüber den uninephrektomierten Kaninchen erhöht ($p < 0.005$).

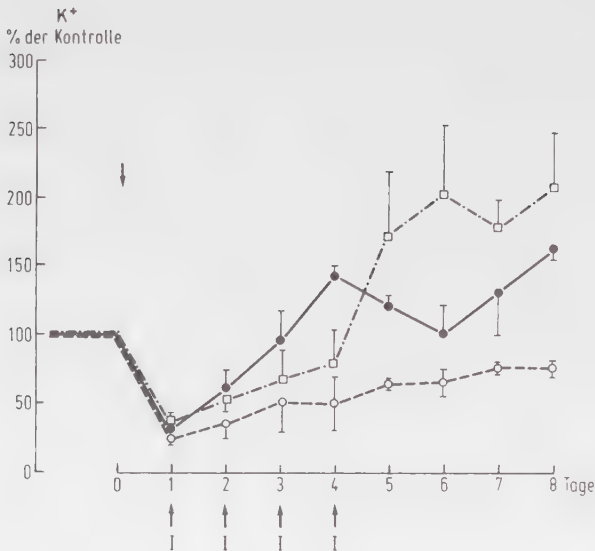


Abb. 20

K-Ausscheidung (MW $\pm$ SE)

————— nach Uninephrektomie n=6
 - - - - - nach Sham-Operation n=3
 - . - . - . nach Uninephrektomie und Indomethacin
 (+I) n=6

Abszisse: Tage nach Uninephrektomie bzw. Sham-Operation

Ordinate: Urinvolumen in % der Kontrollperiode (eine Niere)

Individueller Kurvenverlauf

Um individuelle Verläufe von Urinvolumen, Na-, K-, und PGE-Ausscheidung bei den Kaninchen vor und nach Uninephrektomie bzw. Shamoperation festzustellen, wurden die einzelnen Daten von 2 shamoperierten Kaninchen und von 2 uninephrektomierten Kaninchen als Beispiel dargestellt (Abb. 21 und 22). Bemerkenswert ist die unterschiedlich große PGE-Ausscheidung bei gleicher Na- und Urinvolumenausscheidung der beiden shamoperierten Kaninchen, sowie die quantitativen Unterschiede der PGE-, Na- und Urinvolumenausscheidung nach Uninephrektomie.

b) Ergebnisse der Akutversuche (Abb. 23, 24; Tab. 15 - 22)

Innerhalb von 30 Min. nach Uninephrektomie war eine durchschnittliche Erhöhung der PGE-Ausscheidung der Restniere um 370 %, der Na-Ausscheidung um 400 % und des Urinvolumens um 150 % gegenüber der letzten Kontrollperiode (30 Min.) festzustellen. Die Änderungen waren jeweils auch gegenüber den Werten der shamoperierten Kaninchen (n=2) signifikant ($p < 0.025$). Für die K-Ausscheidung ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollperiode bzw. zu den Werten der shamoperierten Kaninchen. 1 h nach Uninephrektomie waren die erhöhten Werte für die PGE- und Na-Ausscheidung und für das Urinvolumen wieder auf die Ausgangshöhe zurückgekehrt. Auch während der folgenden 2h waren keine Änderungen dieser Parameter gegenüber der Kontrollperiode bzw. den Werten der Kontrolltiere mehr festzustellen. Der Blutdruck war bei den uninephrektomierten wie bei den shamoperierten Kaninchen während der 1. Stunde nach der Uninephrektomie bzw. Shamoperation um 10 % gegenüber dem Wert der Kontrollperiode gesenkt und stieg in der 2. Stunde wieder langsam an.

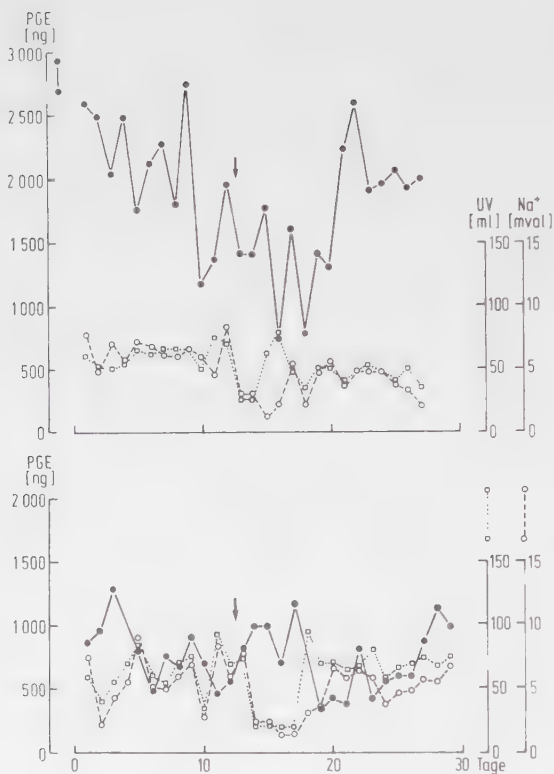


Abb. 21

Verlauf der PGE-, der Na-Ausscheidung und des Urin-
volumens, angegeben pro Niere und 24 h, bei 2 Kanin-
chen vor und nach Shamoperation (Pfeil)

————— PGE-Ausscheidung
..... Urinvolumen
----- Na-Ausscheidung

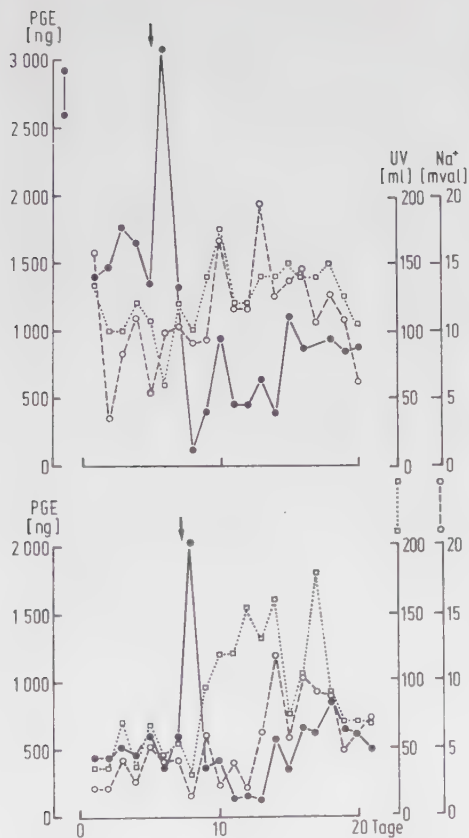


Abb. 22

Verlauf der PGE-, Na-Ausscheidung und des Urinvolumens, angegeben pro Niere und 24 h, bei 2 Kaninchen vor und nach Uninephrektomie (Pfeil)

————— PGE-Ausscheidung
 Urinvolumen
 - - - - - Na-Ausscheidung

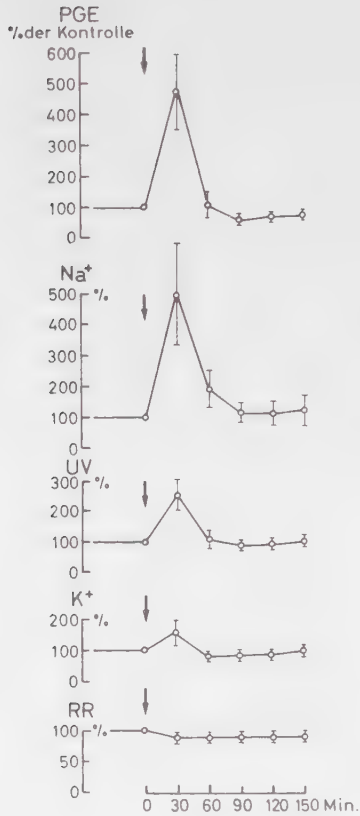


Abb. 23

PGE-, Na- und K-Ausscheidung, Urinvolumen und Blutdruck 0 - 150 Min. nach Uninephrektomie (Pfeil), n=5

Abszisse: Zeit nach Uninephrektomie in Minuten

Ordinate: Werte pro Niere in % der letzten Kontrollperiode (30 Min.)

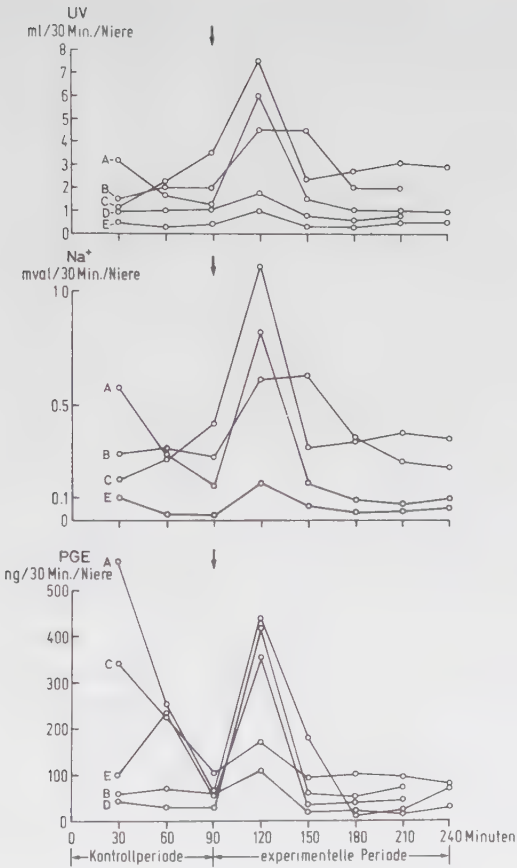


Abb. 24

Urinvolumen, Na- und PGE-Ausscheidung während der Kontrollperiode und 0 - 150 Min. nach Uninephrektomie (Pfeil) bei einzelnen Kaninchen (A - E).

Abszisse: Zeit in Minuten

Ordinate: Absolutwerte pro Niere und 30 Min.

C Diskussion zu den Uninephrektomie-Versuchen

Die nach Uninephrektomie sich in der Restniere abspielenden Veränderungen sind morphologischer, biochemischer und funktioneller Art. Biochemische Veränderungen (eine Zunahme des Phospholipid-, RNS- und Proteinstoffwechsels) sowie morphologische Veränderungen (eine Zunahme von Zellmembranen und Zellorganellen) werden bereits in den ersten Stunden und Tagen nach Uninephrektomie gefunden (113, 114, 60, 47). Bezüglich des Zeitpunktes der funktionellen Veränderungen, besonders der Erhöhung der GFR und der damit verbundenen Zunahme der Na-Reabsorption liegen unterschiedliche Befunde vor: einerseits wurde bereits innerhalb 30 Min. nach Uninephrektomie eine Erhöhung der GFR festgestellt (87), andererseits wurde in den ersten Stunden nach Uninephrektomie keine Veränderung der GFR gefunden, sondern erst nach 3 Tagen, nachdem morphologische und biochemische Veränderungen bereits erfolgt waren (49, 52). Auch hinsichtlich des Zeitpunktes der Erhöhung des renalen Blutflusses (RBF) sind widersprüchliche Ergebnisse vorhanden: einerseits wurde bei Hunden ein schon innerhalb weniger Minuten nach Uninephrektomie erhöhter RBF gefunden (55), andererseits wurde bei Ratten auch 4 h nach Uninephrektomie keine Zunahme des RBF festgestellt (87). Während die Daten über den Zeitpunkt der funktionellen Anpassung nicht einheitlich sind, liegen bezüglich der Veränderung einzelner funktioneller Parameter - zu einem späteren Zeitpunkt gemessen - keine unterschiedlichen Befunde vor: Neben einem erhöhten RBF wurde eine Zunahme der GFR (40 - 70 %) und der Na-Reabsorption einerseits, sowie eine Zunahme der Na-Ausscheidung und des Urinvolumens andererseits gefunden (49, 123, 91).

Die Frage, inwieweit renale PG's, besonders PGE für die funktionellen Veränderungen nach Uninephrektomie von Bedeutung sind, ist für die Aufklärung physiologischer

Funktionen von renalem PGE_2 sowie für das Verständnis der funktionellen Anpassung der Restniere nach Uninephrektomie aus folgenden Gründen von besonderem Interesse:

- (1) Toback et al fanden bei der Maus bereits 5 Min. nach Uninephrektomie eine erhöhte Phospholipid-Stoffwechselaktivität in der verbleibenden Niere; diese war noch für zwei Tage nach Uninephrektomie erhöht (114). Da die Phospholipide der Niere einen hohen Gehalt an Arachidonsäure besitzen (23), ist auf Grund eines erhöhten endogenen PG-Präkursorangebotes eine in den ersten Tagen nach Uninephrektomie gesteigerte PG-Synthese sehr wahrscheinlich.
- (2) Die Untersuchungen von Nekrasova et al (82) unterstützen diese Vermutung: sie bestimmten den Gehalt von vasodilatatorischen, blutdrucksenkenden PG-ähnlichen Substanzen im Nierenmark und elektronenmikroskopisch die Anzahl der lipid droplets in den renomedullären Interstitialzellen bei normalen und uninephrektomierten Kaninchen. Auf Grund eines in den ersten 2 Wochen verminderten Gehaltes der PG-ähnlichen Substanzen und einer Abnahme der Anzahl der lipid droplets in den ersten beiden Tagen nach Uninephrektomie in der Restniere vermuteten sie eine vermehrte PG-Synthese und PG-Freisetzung besonders in den ersten Tagen nach Uninephrektomie.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte nur am ersten Tag nach Uninephrektomie eine gegenüber der Kontrollperiode gesteigerte PGE -Ausscheidung beobachtet werden. Am 2. Tag hatte sie bereits wieder die Werte der Kontrollperiode erreicht und zeigte keine weiteren Veränderungen mehr während der folgenden 6 Tage. Nach den oben genannten Untersuchungen von Toback et al und Nekrasova et al wäre eine über mindestens zwei Tage erhöhte PGE -Ausscheidung zu erwarten gewesen. Der Grund

für die nur am 1. Tag erhöhte PGE-Ausscheidung könnte darin zu suchen sein, daß die renale PG-Synthese zwar längere Zeit erhöht ist, sie jedoch in eine andere Richtung gelenkt wird, so daß statt PGE_2 vermehrt andere PG's, möglicherweise $\text{PGF}_{2\alpha}$ gebildet werden.

Während die PGE-Ausscheidung ausschließlich am 1. Tag nach Uninephrektomie erhöht war, war die Zunahme des Urinvolumens und der Na-Ausscheidung erst am 2. Tag nach Uninephrektomie gegenüber der Kontrollperiode deutlich. Die Ursache für die spätere Zunahme der Na- und H_2O -Ausscheidung ist sicher eine verminderte Wasser- und Futteraufnahme der durch die Operation beeinträchtigten Kaninchen: die shamoperierten Kaninchen zeigten eine Verminderung der Na- und H_2O -Ausscheidung in den ersten Tagen nach der Operation. Die Verminderung der K-Ausscheidung aller untersuchten Gruppen in den ersten Tagen nach Uninephrektomie bzw. Shamoperation ist wahrscheinlich ebenfalls Ausdruck einer gestörten Bilanz.

Das Urinvolumen und die Na-Ausscheidung waren während der ersten Woche nach Uninephrektomie erhöht. Korrelationen zur PGE-Ausscheidung ergaben sich nicht, so daß PGE für die Aufrechterhaltung der Diurese und Natriurese nach Uninephrektomie nicht verantwortlich gemacht werden kann. Inwieweit PGE jedoch bei der initialen Zunahme der Natriurese und Diurese nach Uninephrektomie eine Rolle spielt, bleibt offen. Eine indirekte Beeinflussung wäre möglich, da nach Indomethacin neben einer stark reduzierten PGE-Ausscheidung ein hemmender Einfluß auf die Zunahme des Urinvolumens am 2. Tag nach Uninephrektomie festzustellen war. Auch der Urinvolumenanstieg, der sofort nach Absetzen des Indomethacins am 5. Tag nach Uninephrektomie erfolgte, ist bemerkenswert. Dieser Urinvolumenanstieg war zwar von einer Zunahme der PGE-Ausscheidung begleitet; die PGE-Ausscheidung war jedoch gegenüber der Kontrolle immer

noch erniedrigt und nicht etwa im Sinne eines Rebound-Effektes erhöht, welcher von Solez et al nach einmaliger intraperitonealer Indomethacingabe bei Mäusen beschrieben wurde (103). PGE kommt daher für den nach Absetzen des Indomethacins eintretenden Urinvolumenanstieg nicht in Betracht. Hierfür könnten andere renale PG's verantwortlich sein. Auch weitere außer der PG-Synthesehemmung vorhandene pharmakologische Wirkungen von Indomethacin, wie z. B. die Hemmung der Phosphodiesterase wären denkbar.

Während in den chronischen Uninephrektomieversuchen eine zeitliche Dissoziation in den Veränderungen der PGE- und Na-Ausscheidung und des Urinvolumens erkennbar war, zeigten die Veränderungen in den akuten Uninephrektomieversuchen ein zeitlich gleichförmiges Bild: in den ersten 30 Min. nach Uninephrektomie waren sowohl die PGE-Ausscheidung, als auch das Urinvolumen und die Na-Ausscheidung erhöht. Nach 1h hatten alle Parameter die Ausgangswerte wieder erreicht. Während dieser vorübergehenden Erhöhung der genannten Parameter konnte keine Korrelation der PGE-Ausscheidung zur Na-Exkretion oder zum Urinvolumen gefunden werden. PGE kann daher für die erhöhte Natriurese und Diurese in den ersten 30 Min. direkt nicht verantwortlich sein. PGE könnte jedoch die Diurese und Natriurese indirekt über eine Änderung der Häodynamik beeinflussen, indem es über eine Erhöhung des RBF die Na- und H_2O -Reabsorption vermindern und dadurch die Natriurese und Diurese erhöhen würde. Die Frage erhebt sich, warum die Zunahme des Urinvolumens, der Na- und PGE-Ausscheidung nur in den ersten 30 Min. nach Uninephrektomie festzustellen war. An sich müßten bei gleicher Infusionsgeschwindigkeit die Na-Ausscheidung und das Urinvolumen der Restniere nach Uninephrektomie kontinuierlich doppelt so hoch sein. Wahrscheinlich ist jedoch die Fähigkeit des nar- kotisierten Kaninchens, das Blutvolumen in engen Gren-

zen konstant zu halten, auf Grund einer Beeinflussung zentraler Blutvolumenregulationen eingeschränkt. Die initiale Erhöhung der Na- und H₂O-Ausscheidung könnte dann auf eine durch die Narkose nicht beeinflusste autonome renale Regulation des Blutvolumens zurückzuführen sein. Bemerkenswert ist, daß die initiale Erhöhung der Natriurese und Diurese nach Uninephrektomie trotz eines leicht verminderten Blutdruckes (10 %) eintrat.

Als mögliche Erklärung für die initial gesteigerte Diurese und Natriurese der Restniere nach Uninephrektomie ist demnach folgende Kausalkette denkbar:

Zunahme des Phospholipidmetabolismus

|

Zunahme der PGE-Synthese

|

Zunahme des RBF

|

Verminderung der tubulären Na- und H₂O-Reabsorption

|

Zunahme der Diurese und Natriurese

V Zusammenfassung

Für die quantitative Bestimmung von PGE im Kaninchen- und Human-Urin wurde primär der Bioassay am rat fundus strip verwendet. Außerdem wurde als Methode für die quantitative Bestimmung von PGE im Urin der Radioimmunoassay untersucht, da er gegenüber dem Bioassay eine größere Empfindlichkeit, Genauigkeit und Praktikabilität besitzt. Für die PGE-Messung standen PGB-Antikörper zur Verfügung, so daß für die radioimmunologische Messung eine chemische Konversion von PGE zu PGB notwendig war. Die Konversion eröffnete dabei die Möglichkeit, die Spezifität der radioimmunologischen PGE-Messung im Kaninchen- und Humanurin nachzuprüfen. Während der Radioimmunoassay für die PGE-Messung im Humanurin sich dabei als unbrauchbar herausstellte, war er für die PGE-Messung im Kaninchenurin geeignet. Zur weiteren Prüfung der radioimmunologischen Bestimmung von PGE im Kaninchenurin wurde der PGE-Gehalt von 100 verschiedenen Kaninchenurinen parallel radioimmunologisch und biologisch bestimmt. Dabei ergab sich eine hochsignifikante Korrelation zwischen beiden Bestimmungsmethoden.

Um Änderungen der renalen PGE-Synthese nach Uninephrektomie zu erfassen, wurde die PGE-Ausscheidung im Kaninchenurin vor und nach Uninephrektomie bestimmt. Dabei fand sich in den chronischen Versuchen eine ausschließlich am ersten Tag nach Uninephrektomie gegenüber der Kontrollperiode erhöhte PGE-Ausscheidung. Es ergab sich keine Korrelation zu der besonders am 2. Tag eintretenden Zunahme von Urinvolumen und Na-Exkretion. Der PG-Synthesehemmer Indomethacin hatte auf den Anstieg des Urinvolumens nach Uninephrektomie einen hemmenden Einfluß. Nach Absetzen von Indomethacin war eine beträchtliche Zunahme des Urinvolumens festzustellen.

In Akutversuchen wurden während der ersten 30 Min. nach Uninephrektomie eine erhöhte PGE-, Na-Ausscheidung und eine Zunahme des Urinvolumens gefunden. Nach einer Stunde waren die erhöhten Werte wieder zur Norm zurückgekehrt.

Auch hier konnten keine Korrelationen zwischen PGE-Ausscheidung und Na-Ausscheidung bzw. Urinvolumen gefunden werden. Eine direkte Beeinflussung der Diurese und Natriurese durch PGE ist daher unwahrscheinlich. Eine initiale Änderung der renalen Hämodynamik durch PGE und eine dadurch bedingte indirekte Beeinflussung der Na- und H₂O-Ausscheidung nach Uninephrektomie wäre jedoch möglich.

Weiterhin wurde festgestellt, daß die PGE-Ausscheidung sowie die PGE-Konzentration im Urin während der Kontrollperiode in den Akut-Versuchen höher war als in den chronischen Versuchen. Als Ursache für diese Unterschiede wurden die Narkose und der Operationsstreß in den Akut-Versuchen wahrscheinlich gemacht.

VI

A n h a n g :

Tabellarische Zusammenfassung der
Ergebnisse der Uninephrektomie-Versuche

Tabelle 4

Chronische Versuche

Kaninchen nach Uninephrektomie: tägliche PGE-Ausscheidung pro Niere in % der Kontrollperiode (n=9)

Kaninchen-Nr.	44	46	48	49	85	86	36	39	43	Mittelwert	SE	Signifikanz zur Kontrollperiode
PGE der Kontrollperiode/Niere												p
ng ± SD	926 ± 99	1380 ± 194	1288 ± 245	495 ± 102	1535 ± 201	610 ± 122	707 ± 87	501 ± 126	806 ± 275	916 ± 393		
100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
Tage nach Uninephrektomie												
1	250	242	146	408	192	45	330	57	116	198	41	0.05
2	140	84	55	73	76	5	271	57	116	97	25	N.S.
3	28	7	73	85	224	5	41	244	29	82	30	N.S.
4	336	26	69	5	115	51	87	80	53	91	32	N.S.
5	259	60	36	5	162	0	143	154	113	104	29	N.S.
6	146	29	63	26	56	25	138	207	131	91	22	N.S.
7	160	29	60	115	64	186	128	176	77	111	19	N.S.
8	182	41	60	68			111	55	62	83	18	N.S.
32							111	147	44	100	30	N.S.
33							91	101	37	76	11	N.S.
34							129	73	47	83	23	N.S.
35							93	101	37	77	19	N.S.

Tabelle 5

Chronische Versuche

Kaninchen nach Sham-Operation: tägliche PGE-Ausscheidung pro Niere in %
der Kontrollperiode (n=5)

Kaninchen Nr.	45	47	94	40	42	Mittel- wert	SE	Signifikanz zur Kontroll- periode p
PGE der Kontroll- periode/Niere ng $\pm$ SD	1576 $\pm$ 372	620 $\pm$ 130	226 $\pm$ 127	627 $\pm$ 294	1180 $\pm$ 243	845 $\pm$ 531		
	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
Tage nach Sham-Operation								
1	91	163	200	41	64	112	30	N.S.
2	91	163	100	41	47	88	22	N.S.
3	113	56	36	16	64	57	16	N.S.
4	47	56	70	40	46	52	5	0.005
5	102	190	85	72	110	112	21	N.S.
6	50	110	82	102	77	84	11	N.S.
7	90	55	142	115	47	90	18	N.S.
8	82	69	225	42	45	93	34	N.S.

Tabelle 6

Chronische Versuche

Kaninchen nach Uninephrektomie und Indomethacin (Indomethacingabe von

Tag 1 - 4 nach Uninephrektomie (+ J)): tägliche PGE-Ausscheidung pro Niere in %
der Kontrollperiode (n=6)

Kaninchen Nr.	77	78	83	90	92	93	Mittel- wert	SE	Signifikanz zur Kontroll- periode
PGE der Kontroll- periode/Niere									p
ng $\pm$ SD	936 +393 —	488 +110 —	761 +141 —	2503 +963 —	652 +130 —	443 +123 —	963 +775 —		
	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
Tage nach Uninephrektomie									
1 + J	18	0	6	41	138	0	34	22	0.05
2 + J	123	0	16	28	0	0	28	20	0.025
3 + J	30	0	0	0	0	0	5	5	0.005
4 + J	22	0	0	0	39	0	10	7	0.005
5	54	116	53	0	0	43	44	18	0.02
6	60	78	80	4	0	51	45	14	0.02
7	64	49	114	10	9	61	51	16	0.05
8	0	43	108	41	9	41	40	15	0.02

Tabelle 7

Chronische Versuche

Kaninchen nach Uninephrektomie: tägliches Urinvolumen (UV) pro Niere in % der Kontrollperiode (n=9)

Kaninchen-Nr.	36	39	48	49	85	86	44	46	43	Mittelwert in %	SE	Signifikanz zur Kontrollperiode
UV der Kontrollperiode/Niere	59 +15	95 +23	72 +15	51 +14	69 +4	123 +10	86 +6	106 +9	95 +7	84 ± 23		p
ml ± SD	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100 %		
Tage nach Uninephrektomie	1	85	68	333	59	101	7	58	57	79	31	N.S.
2	102	68	444	186	319	171	186	113	79	185	41	0.05
3	186	295	361	235	333	150	151	94	274	231	31	0.0025
4	136	211	250	235	326	130	203	132	253	208	22	0.0025
5	153	253	167	304	413	199	145	165	168	219	30	0.0025
6	161	158	194	255	333	106	186	113	389	211	32	0.005
7	136	247	556	314	232	146	140	113	126	223	47	0.005
8	136	158	472	147		209		132	179	205	46	0.005
32	245	194							147	195	28	0.005
33	203	241							147	197	27	0.005
34	220	188							157	188	17	0.005
35	186	267							189	214	26	0.005

- 90 -

Tabelle 8

Chronische Versuche

Kaninchen nach Sham-Operation: tägliches Urinvolumen pro Niere in %
der Kontrollperiode (n=5)

Kaninchen Nr.	45	47	94	40	42	Mittel- wert	SE	Signifikanz zur Kontroll- periode
UV der Kontroll- periode/Niere	65±11	77±6	104±28	59±12	75±23	76 ± 17		p
ml ± SD	100%	100%	100%	100%	100%	100 %		
Tage nach Sham-Operation	1	2	3	4	5	6	7	8
	36	35	29	63	11	35	8	0.005
	36	35	111	63	140	77	21	N.S.
	95	26	96	85	127	86	7	N.S.
	123	26	91	97	120	91	18	N.S.
	77	123	82	169	116	113	17	N.S.
	54	91	111	161	107	105	17	N.S.
	77	94	173	169	87	120	21	N.S.
	77	84	125	114	93	99	9	N.S.

Tabelle 9

Chronische Versuche

Kaninchen nach Uninephrektomie und Indomethacin (Indomethacingabe von Tag 1 - 4 nach Uninephrektomie; +J): tägliches Urinvolumen pro Niere in % der Kontrollperiode (n=6)

Kaninchen Nr.	77	78	83	90	92	93	Mittelwert	SE	Signifikanz zur Kontrollperiode
UV der Kontrollperiode/Niere ml $\pm$ SD	44 $\pm$ 2 100%	71 $\pm$ 22 100%	63 $\pm$ 7 100%	86 $\pm$ 25 100%	85 $\pm$ 14 100%	98 $\pm$ 25 100%	75 $\pm$ 19 100 %		p
Tage nach Uninephrektomie	1 + J	42	22	41	212	61	78	28	N.S.
2 + J	273	42	135	151	118	51	128	34	N.S.
3 + J	159	254	198	244	59	235	192	30	0.05
4 + J	136	127	222	250	59	230	171	31	0.05
5	239	676	333	244	118	408	336	79	0.025
6	352	563	413	209	176	214	321	61	0.01
7	352	296	611	145	141	158	284	75	0.05
8	443	127	397	140	365	173	274	58	0.025

Tabelle 10

Chronische Versuche

Kaninchen nach Uninephrektomie: tägliche Na-Ausscheidung pro Niere
in % der Kontrollperiode (n=5)

Kaninchen Nr.	44	46	48	49	85	Mittel- wert	SE	Signifikanz zur Kontroll- periode
Na der Kontroll- periode/Niere	6.65 +0.46	7.1 +3.26	6.62 +1.8	4.05 +1.16	6.0 +1.8	6.1 +1.2		
mval $\pm$ SD	100%	100%	100%	100%	100%	100%		p
Tage nach Uninephrektomie	60	141	123	37	338	142	53	N.S.
1	209	146	308	153	205	204	50	N.S.
2	191	129	30	57	293	140	47	N.S.
3	71	131	106	49	137	99	16	N.S.
4	19	236	75	153	221	140	41	N.S.
5	53	164	211	296	102	165	42	N.S.
6	101	164	193	143	115	161	14	N.S.
7	227	276	205	252		240	15	0.005
8								0.005

Tabelle 12

Chronische Versuche

Kaninchen nach Uninephrektomie: tägliche K-Ausscheidung pro Niere
in % der Kontrollperiode (n=6)

Kaninchen Nr.	44	46	48	49	85	86	Mittel- wert	SE	Signifi- kanz zur Kontroll- periode
K ⁺ der Kontroll- periode/Niere							20.9		p
mval $\pm$ SD	22.7 $\pm$ 3.2	22.9 $\pm$ 2.8	16 $\pm$ 3.4	11 $\pm$ 2.9	23 $\pm$ 2.8	29.8 $\pm$ 3.4	20.9 +6.5		
	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %		
Tage nach Uninephrektomie									
1	41	43	31	18	36	5	29	6	0.005
2	36	70	48	28	57	126	60	14	0.05
3	44	117	155	55	70	152	98	20	N.S.
4	150	146	215	209	30	107	144	6	0.005
5	97	110	135	148	99	139	121	8.5	N.S.
6	67	110	168	127	25	118	102	20	N.S.
7	103	135	127	269	17	145	132	33	N.S.
8	185	143		163			163	8.5	0.005

- 94 -

Chronische Versuche

Tabelle 13

Kaninchen nach Sham-Operation: tägliche K-Ausscheidung pro Niere
in % der Kontrollperiode (n=3)

Kaninchen Nr.	45	47	94	Mittel- wert	SE	Signifikanz zur Kontroll- periode
K der Kontroll- periode/Niere						
mval $\pm$ SD	17.7 $\pm$ 3.8	17.9 $\pm$ 6	23.8 $\pm$ 52	19.8 $\pm$ 3.4		p
	100%	100%	100%	100%		
Tage nach Sham-Operation						
1	27	20	26	24	2	0.005
2	27	20	58	35	11	0.005
3	82	10	62	51	21	N.S.
4	70	11	72	50	20	N.S.
5	60	64	71	64	3.4	0.005
6	50	63	87	66	10.3	0.05
7	70	87	76	77	4.6	0.05
8	65	73	90	76	6.9	0.05

Chronische Versuche

Tabelle 14

Kaninchen nach Uninephrektomie und Indomethacin
von Tag 1 - 4 nach Uninephrektomie + J):

tägliche K-Ausscheidung pro Niere in % der Kontrollperiode (n=6)

Kaninchen Nr.	77	78	83	90	92	93	Mittel- wert	SE	Signifikanz zur Kontroll- periode
K der Kontroll- periode/Niere									
mval $\pm$ SD	8.6 $\pm$ 1.9	15 $\pm$ 1.5	16.9 $\pm$ 2.9	15.5 $\pm$ 1.2	20.7 $\pm$ 4.2	17.1 $\pm$ 3.7	15.6 $\pm$ 3.9		p
Tage nach Uninephrektomie	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
1 + J	65	36	10	23	21	56	35	9	0.005
2 + J	44	36	92	62	48	29	52	9	0.01
3 + J	97	16	151	27	24	94	68	22	N.S.
4 + J	48	16	161	117	24	111	80	24	N.S.
5	84	64	285	298	92	233	176	43	N.S.
6	116	53	353	319	130	243	202	49	0.05
7	174	84	216	237	163	190	177	21	0.01
8		84	358	193	194	208	207	39	0.05

Tabelle 15

Akutversuche

Kaninchen nach Uninephrektomie: PGE-Ausscheidung pro Niere und
30 Min. in % der Kontrollperiode

Kaninchen Nr.	1	2	3	4	5	Mittel- wert	SE	Signifikanz zur Kontroll- periode
PGE- der Kontroll- periode/Niere								
ng	57	62	105	55	64	68		p
	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
Min. nach Uninephrektomie								
0 - 30	193	677	161	644	688	472	120	0.05
31 - 60	33	103	84	64	280	112	43	N.S.
61 - 90	30	87	96	75	16	61	15	N.S.
91 - 120	32	116	91	84	36	72	16	N.S.
121 - 150	53		69		108	76	12	N.S.

Tabelle 16

Akutversuche

Kaninchen nach Uninephrektomie: Urinvolumen (UV) pro Niere und
30 Min. in % der Kontrollperiode

Kaninchen Nr.	1	2	3	4	5	Mittel- wert	SE	Signifikanz zur Kontroll- periode p
UV der Kontroll- periode/Niere ml	2.1	1.3	3.65	0.4	1.3	1.7 ± 1.2		
	100%	100%	100%	100%	100%	100%		

Min. nach
Uninephrektomie

0 - 30	210	138	205	240	469	252	56	0.05
31 - 60	214	57	63	87	115	107	28	N.S.
61 - 90	143	50	74	100	77	89	15	N.S.
91 - 120	100	69	85	137	77	94	12	N.S.
121 - 150	95		79	150	77	100	15	N.S.

Tabelle 17

Akutversuche

Kaninchen nach Uninephrektomie: Na-Ausscheidung pro Niere und
30 Min. in % der Kontrollperiode

Kaninchen Nr.	1	3	4	5	Mittel- wert	SE	Signifikanz zur Kontroll- periode
Na der Kontrollperiode/ Niere	0.272	0.423	0.017	0.15	0.215		p
mval	100%	100%	100%	100%	100%		
Min. nach Uninephrektomie							
0 - 30	226	270	953	546	498	167	0.05
31 - 60	232	75	341	106	188	61	N.S.
61 - 90	129	81	206	53	117	33	N.S.
91 - 120	92	89	224	46	112	39	N.S.
121 - 150	83	83	265	60	122	47	N.S.

Tabelle 18

Akutversuche

Kaninchen nach Uninephrektomie: K-Ausscheidung pro Niere und
30 Min. in % der Kontrollperiode

Kaninchen Nr.	1	3	4	5	Mittelwert	SE	Signifikanz zur Kontrollperiode
K der Kontroll- periode/Niere							p
mval	0.081	0.065	0.078	0.13	0.88		
	100%	100%	100%	100%	100%		
Min. nach Uni- nephrektomie							
0 - 30	159	150	261	74	161	38	N.S.
31 - 60	67	80	114	81	85	10	N.S.
61 - 90	60	103	124	71	89	15	N.S.
91 - 120	71	114	121	79	96	12	N.S.
121 - 150	103	106	124	87	105	7.5	N.S.

Tabelle 19

Akutversuche

Kaninchen nach Sham-Operation (n=2): PGE-Ausscheidung pro Niere und
30 Min. in % der Kontrollperiode

Kaninchen Nr. PGE der Kontroll- periode/Niere ng	6	7	Mittelwert	SE	Signifikanz zur Kontrollperiode p
	55	35	45		
	100 %	100 %	100 %		

Min. nach Sham-
Operation

0 - 30	144	86	115	29	N.S.
31 - 60	144	77	110	33	N.S.
61 - 90	91	77	84	7	N.S.
91 - 120	91	99	95	4	N.S.

Tabelle 21

Akutversuche

Kaninchen nach Uninephrektomie: arterieller Blutdruck in %
der Kontrollperiode

Kaninchen	1	2	3	4	5	Mittelwert	SE	Signifikanz zur Kontrollperiode p
Blutdruck der Kontroll- periode mm Hg	90	100	95	95	75	91		
	100%	100%	100%	100%	100%	100%		
Min. nach Uninephrekto- mie	96	85	95	79	85	88	4	0.01
0 - 30								
31 - 60	100	93	89	89	83	91	3	0.05
61 - 90	103	92	89	95	85	93	4	0.05
91 - 120	103	95	86	97	91	94	3	0.05
121 - 150	100		93	97	93	96	2	0.05

VII L i t e r a t u r

- 1 Allen RB, Bollman JL, Mann FC:
Effect of resection of large fractions of renal substance. Arch.Pathol.19: 174-184, 1935
- 2 Aiken JW, Vane R:
Intrarenal prostaglandin release attenuates the renal vasoconstrictor activity of angiotensin. J.Pharm.Exp.Ther. 184: 678-687, 1973
- 3 Änggård E, Larsson C, Samuelsson B:
The distribution of 15-hydroxy-prostaglandin dehydrogenase and prostaglandin- Δ 13-reductase in tissues of the swine.
Acta physiol. scand.81: 396, 1971
- 4 Änggård E: Studies on the analysis and metabolism of the prostaglandins.
Ann. New York Acad. Scienc. 180: 200-217, 1971
- 5 Aratiki M: Experimental researches on the compensatory enlargement of the surviving kidney after unilateral nephrectomy
Am.J.Anat. 36: 437-450, 1926
- 6 Barry E, Hall WJ: Stimulation of sodium movement across frog skin by prostaglandin E₁
J. Physiol.London 200: 83, 1969
- 7 Beck NP, Field JB, Davies B:
Effect of prostaglandin E₁, chlorpropamide (CPM) and vasopressin (VP) on cyclic 3, 5, adenosine monophosphat (c-AMP) in renal medulla of rats.
Clin.Res. 18: 494; 1970

- 8 Bergström S, Ryhage R, Samuelsson B, Sjövall J:
Structure of prostaglandin E_1 , F_1 and F_2 .
Acta.Chem.Scand. 16: 501, 1962

- 9 Bergström S, Carlson LA, Weeks JR:
The prostaglandins; a family of biologically active
lipids. Pharmacol.Rev. 20: 1-48, 1968

- 10 Bergström S, Danielsson H and Samuelsson B:
The enzymatic formation of prostaglandin E_2 from
arachidonic acid. Biochim.Biophys.
Acta 90: 207-210, 1964

- 11 Bergström S: Quantitative aspects on prostaglandin
synthesis in man.
Adv.Biosci. 9: 7-14, 1973

- 12 Bohman SO, Larsson C:
Prostaglandin synthesis in membrane fractions from
the rabbit renal medulla.
Acta physiol.scand. 94: 244-258, 1975

- 13 Bradley SE, Chien KCH, Coelho JB, Mason RC:
Effect of uninephrectomy on glomerulotubular functional-structural balance in the dog.
Kidney Intern. 5: 122-130, 1974

- 14 Brunner HC, Storage life of prostaglandin E_2 in
ethanol and saline.
J.Pharmac. 23: 804, 1971

- 15 Carriere S, Thorburn GD, O' Morchoe CCC, Barger AC:
Intrarenal distribution of blood flow in dogs during
hemorrhagic hypotension.
Circ.Res. 19: 167, 1966

- 16 Chang LCT, Splawinski JA, Oates JA, Nies AS:
Enhanced renal prostaglandin production in the dog.
II Effects on intrarenal hemodynamics.
Circ.Res.36: 204-207, 1975

- 17 Christ EJ, van Dorp DA:
Comparative aspects of prostaglandin biosynthesis
in animal tissues.
Biochim. Biophys.Acta 270: 537-545, 1972

- 18 Comai K, Prose P, Farber SJ:
Correlation of renal medullary prostaglandin con-
tent and renal interstitial cell lipid droplets.
Prostaglandins 6: 375-379, 1974

- 19 Crutchley DJ, Piper PJ:
Comparative bioassay of prostaglandin E₂ and its
three pulmonary metabolites.
Brit.J.Pharmacol.54: 397-399, 1975

- 20 Daniels EG, Hinman JW, Leach BE, Muirhead EE:
Identification of prostaglandin E₂ as the principal
vasodepressor lipid of rabbit renal medulla.
Nature (Lond) 215: 1298, 1967

- 21 Dorp van D, Beerthuis RK, Nugteren DH, Vonkeman H:
The biosynthesis of prostaglandins.
Biochim.Biophys.Acta 90: 204-207, 1964

- 22 Dray F, Charbonnel B, Macclouf J:
Radioimmunoassay of prostaglandins F , E₁ und E₂
in human plasma.
Europ.J.Clin.Invest.5: 311-318, 1975

- 23 Druilhet RE, Overturf ML, Kirkendall WM:
Structure of neutral glycerides and phosphoglycerides
of human kidney. Int.J.Biochem.6: 893-901, 1975

- 24 Earley LE, Friedler RM:
J.Clin.Invest.44: 929-941 und 1855-1857, 1965
- 25 Emerson TE, Jelks GW, Daugherty RM, Hodgman RE:
Effects of prostaglandin E_1 and $F_{2\alpha}$ on venous
return and other parameters in the dog.
Am.J.Physiol.22: 243-249, 1971
- 26 Euler von US:
Über die spezifische blutdrucksenkende Substanz des
menschlichen Prostata- und Samenblasensekretes.
Klin.Wochenschr. 14: 1182-1183, 1935
- 27 Ferreira SH, Vane JR:
Prostaglandins: their disappearance from and
release into the circulation.
Nature 216: 288, 1967
- 28 Flower RJ, Vane JR:
Some pharmacological and biochemical aspects of
prostaglandin biosynthesis and its inhibition.
In: Prostaglandin Synthetase Inhibitors, Eds: HJ
Robinson and JR Vane, Raven Press, New York,
pp. 9-18, 1974
- 29 Fröhlich JC, Sweetman BJ, Carr K, Splawinski J,
Watson JT, Änggard E, Cates JA:
Occurrence of prostaglandins in human urine.
Adv. Biosci. 9: 321-330, 1973
- 30 Fröhlich JC, Wilson TW, Smigel M, Oates JA:
A competitive protein binding assay specific for
prostaglandin E. Biochim.Biophys.Acta 348:
241-248, 1974

- 31 Fröhlich JC, Sweetman BJ, Carr K, Hollifield JW, Oates JA: Assessment of the levels of PGA_2 in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry. Prostaglandins 10: 185-195, 1975
- 32 Fröhlich JC, Wilson TW, Sweetman BJ, Smigel M, Nies AS, Carr K, Watson TJ, Oates JA: Urinary prostaglandins. J.Clin.Invest. 55: 763-770, 1975
- 33 Goldblatt MW: A depressor substance in seminal fluid. J.Soc.Chem.Ind. London 52: 1056-1057, 1933
- 34 Granström E: On the metabolism of prostaglandin E_1 in man. Prostaglandins and related factors. Progr. Biochem.Pharmacol.vol. 3: 89-93, 1967
- 35 Granström E, Samuelsson B: The structure of the main urinary metabolite of prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ in man. J.Am.Chem.Soc. 91: 3398-4000, 1969
- 36 Hamberg M, Samuelsson B: The structure of the major urinary metabolite of prostaglandin E_2 in man. J.Amer.Chem.Soc. 91: 2177-78, 1969
- 37 Hamberg M: Biosynthesis of prostaglandins in the renal medulla of rabbit. Fed.Eur.Biochem.Soc.Letters 5: 127-130, 1969
- 38 Hamberg M, Samuelsson B: On the metabolism of prostaglandins E_1 and E_2 in man. J.Biol.Chem. 246: 6713-21, 1971
- 39 Hamberg M, Samuelsson B: Detection and isolation of an endoperoxide intermediate in prostaglandin biosynthesis. Proc.Natl.Acad. Sci., USA 70: 899-903, 1973

- 40 Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B:
Prostaglandin Endoperoxides. A new concept concerning
the mode of action and **release of prostaglandins**.
Proc.Nat.Acad.Sci. 71: 3824-3828, 1974
- 41 Hamberg M, Hedquist P, Strandberg K, Svensson J,
Samuelsson B: Prostaglandin endoperoxides IV. Effects
on smooth muscle.
Life Sci. 16: 451-462, 1975
- 42 Hayslett JP, Kashgarian M, Epstein FH:
Functional correlates of compensatory renal hyper-
trophy. J.Clin.Invest.47: 774-781, 1968
- 43 Itskovitz HD, McGiff JC:
Hormonal regulation of the renal circulation.
Circ.Res.Suppl.34,35: 65-72, 1974
- 44 Jaffe BM, Behrman HR, Parker CW:
Radioimmunoassay measurement of prostaglandins E,
A and F in human plasma.
J.Clin.Invest. 52: 398, 1973
- 45 Janszen FHA, Nugteren DH:
Histochemical localization of prostaglandin synthe-
tase. Histochemie 27: 159, 1971
- 46 Johnson HA, Roman JMV:
Compensatory renal enlargement. Hypertrophy versus
hyperplasia. Am.J.Pathol. 49:1, 1966
- 47 Johnson HA, Amendola F:
Mitochondrial proliferation in compensatory growth
of the kidney.
Am.J.Pathol.54: 35-45, 1969
- 48 Kapur BML, Balkrishna Rao BN, Das NK:
Effects of operative trauma upon renal function.
Indian J.Med.Res. 60: 1371, 1972

- 49 Katz AJ, Epstein FH:
Relation of glomerular filtration rate and sodium
reabsorption to kidney size in compensatory renal
hypertrophy.
Yale J.Biol.Med. 40: 220-230, 1967
- 50 Katz AJ, Epstein FH:
The role of the sodium-potassium-activated adenosine
triphosphatase in the reabsorption of sodium by the
kidney. J.Clin.Invest.46: 1999-2011, 1967
- 51 Katz AJ: Renal function immediately after contrala-
teral nephrectomy: relation to the mechanism of
compensatory kidney growth.
Yale J.Biol.Med. 43: 164-172, 1970
- 52 Katz AJ, Toback FG, Lindheimer MD:
Independence of onset of compensatory kidney growth
from changes in renal function.
Am.J.Physiol. 230: 1067-1071, 1976
- 53 Katzen DR, Sheng-Shung Pong, Levine L:
Distribution of prostaglandin E 9-Ketoreductase and
NAD - dependant and NADP - dependant 15-Hydroxy-
prostaglandindehydrogenase in the renal cortex and
medulla of various species.
Res.Communic.Chem.Path.Pharmacol.12: 781-787, 1975
- 54 Kirschenbaum MA, Ferris TF, Stein JH:
Natriuretic effect of prostaglandin inhibition
(abstr). Clin.Res.22: 625A, 1974
- 55 Krohn AG, Peng BBK, Antell HJ, Stein S, Waterhouse K:
Compensatory renal hypertrophy: the role of inter-
mediate vascular changes in its production.
J.Urol.103: 564-568, 1970

- 56 Lands WEM, Samuelsson B:
Phospholipid precursors of prostaglandins.
Biochim.Biophys.Acta 164: 426-429, 1968
- 57 Larsson C, Änggård E:
Regional differences in the formation and metabolism
of prostaglandins in the rabbit kidney.
Europ.J.Pharmacol. 21: 30-36, 1973
- 58 Larsson C, Änggård E:
Increased juxtamedullary blood flow on stimulation
of intrarenal prostaglandin biosynthesis.
Europ.J.Pharmacol. 25: 326-334, 1974
- 59 Larsson C, Änggård E:
Mass spectrometric determination of prostaglandin
 E_2 , $F_{2\alpha}$ and A_2 in the cortex and medulla of the
rabbit kidney.
For publication in J.Pharm. and Pharmacol., 1976
- 60 Leak LV, Rosen VL:
Early ultrastructural alterations in proximal tubu-
lar cells after unilateral nephrectomy and X-irradi-
ation. J.Ultrastruct.Res.15: 326-348, 1966
- 61 Lee JB, Covino BG, Takman BH, Smith ER:
Renomedullary vasodepressor substance, medullin:
Isolation, chemical characterization and physio-
logical properties. Circ.Res.17: 57-77, 1965
- 62 Lee JB, Crowshaw K, Takman BH, Attrep KA,
Gougoutas JZ: The identification of prostaglandins
 E_2 , $F_{2\alpha}$ and A_2 from rabbit kidney medulla.
Biochem.J.105: 1251-1260, 1967

- 63 Levine L, Gutierrez-Cernosek RM, Vunakis van H:
J.Biol.Chem. 246:6782, 1971
- 64 Levy SE, Blalock A:
The effects of unilateral nephrectomy on the renal
blood flow and oxygen consumption of unanesthetized
dogs. Am.J.Physiol. 122: 609-613, 1938
- 65 Lipson LC, Sharp GWG:
Effect of prostaglandin E_1 on sodium transport and
osmotic water flow in the toad bladder.
Amer.J.Physiol 220: 1046-1052, 1971
- 66 Lowenstein LM, Stern A:
Serumfactor in renal compensatory hyperplasia.
Science 142: 1479-1480, 1963
- 67 Lyrdal F, Olin T:
Renal blood flow and function in the rabbit after
surgical trauma. Scand.J.Urol.Nephrol.9: 129-141, 1975
- 68 Malik KU, McGiff JC: Modulation by prostaglandins on
adrenergic transmission in the isolated perfused
rabbit and rat kidney.
Circ.Res. 36: 599-609, 1975
- 69 Marschner J., Dobry H, Erhardt F, Landersdorfer T,
Popp B, Ringel C, Scriba P:
Berechnung radioimmunologischer Meßwerte mittels
Spline-Funktionen.Ärztl.Labor 20: 184-191, 1974
- 70 McGiff JC, Terragno NA, Strand JC, Lee JB, Lonigro AJ:
Selective passage of prostaglandins across the lung.
Nature 223: 742-745, 1969

- 71 McGiff JC, Crowshaw K, Terragno NA, Lonigro AJ:
Renal prostaglandins: possible regulators of the
renal actions of pressor hormones.
Nature (Lond) 227: 1255-1257, 1970
- 72 McGiff JC, Terragno NA, Itskovitz HD:
Role of renal prostaglandins as revealed by in-
hibitors of prostaglandin synthetase.
Prostaglandin Synthetase Inhibitors, Raven Press
New York 1973, p. 259 -271
- 73 McGiff JC, Crowshaw K, Itskovitz HD:
Prostaglandins and renal function
Fed.Proc.33: 39-46, 1974
- 74 McGiff JC, Itskovitz HD, Terragno A, Wong PYK:
Modulation and mediation of the action of the renal
kallikrein-kinin system by prostaglandins.
Fed.Proceed. 35: 175-180, 1976
- 75 McNay JL, Abe Y:
Redistribution of cortical blood flow during renal
vasodilation in dogs.
Circ.Res. 27: 1023, 1970
- 76 McNay JL, Miyazaki M:
Regional increases in mass and flow during compen-
satory renal hypertrophy.
Am J.Physiol. 224: 219-222, 1973
- 77 Middleditch BS: PGA: fact or artefact?
Prostaglandins 9: 409-410, 1975
- 78 Miller OV, Magee WE:
Specificity of prostaglandin binding sites in rat fore
stomach tissue and their possible use as a quanti-
tative assay. Adv.Biosci.9: 83-91, 1973

- 79 Moore RA: The number of glomeruli in the kidney of the adult white rat unilaterally nephrectomized in early life. J.exp.Med.50: 709-712, 1929
- 80 Muehrcke RC, Mandal AK, Volini FI:
A pathophysiological review of the renal medullary interstitial cells and their relationship to hypertension. Circ.Res. 27 (suppl.I): 109, 1970
- 81 Muirhead EE, Germain GS, Leach BE, Pitcock JA, Stephenson P, Brooks B, Brosius WL, Daniels EG, Hinman JW:
Synthesis of prostaglandins by renomedullary interstitial cells (RIC) grown in tissue culture. Adv.Biosci.9: 341-347, 1973
- 82 Nekrasova AA, Sokolova RI, Landsberg LA:
Prostaglandinlike renal vasodepressor lipids and electrolyte exchange in the kidney. Adv.Biosci.9: 307-313, 1973
- 83 Nissen HM, Andersen H:
On the localization of a prostaglandin dehydrogenase activity in the kidney. Histochemie 14: 189-200, 1968
- 84 Nissen HM, Bojesen I:
On lipid droplets in renal interstitial cells. IV Isolation and identification. Z.Zellforsch. 97: 274-284, 1969
- 85 Nugteren DH: The determination of prostaglandin metabolites in human urine. J.Biol.Chem. 250: 2809-2812, 1975

- 86 Orloff J, Grantham J:
The effect of prostaglandin E_1 (PGE_1) on the permeability response of rabbit collecting tubules to vasopressin. Nobel Symp. 2, Prostaglandins, S.Bergström and B.Samuelsson, Almquist and Wickel (Stock.1967) 143-146
- 87 Potter DE, Leumann EP, Sakai T, Holliday MA:
Early responses of glomerular filtration rate to unilateral nephrectomy.
Kidney International 5: 131-136, 1974
- 88 Rabito GA, Fasciolo JC:
Effects of prostaglandins PGE_1 and $PGF_{2\alpha}$ on oxygen consumption, sodium and potassium content of renal tissue. Experimenta 29/6: 673-675, 1973
- 89 Ramwell PW, Shaw JE:
Biological significance of the prostaglandins.
Rec.Progr. Hormone Res. 26: 149, 1970
- 90 Russell PT, Eberle A, Cheng HC:
The prostaglandins in the clinical medicine.
A developing role for the clinical chemist.
Clin.Chem. 21/6: 653-666, 1975
- 91 Rous SN, Wakim KG:
Kidney function before, during and after compensatory hypertrophy. J.Urol. 98: 30-35, 1967
- 92 Samuelsson B:
Isolation and identification of prostaglandins from human seminal plasma. J.Biol.Chem. 238: 3229-3234, 1963
- 93 Samuelsson B: Biosynthesis and metabolism of prostaglandins. Proc.4th Int.Congr.Pharmacol,Basle, Schwabe Basle 4: 12-31, 1970

- 94 Samuelsson B et al:
Round table discussion on analytical methods.
Adv.Biosci. 9: 121-123, 1973
- 95 Samuelsson B, Hamberg M, Malmsten C, Svensson J:
Physiological role of prostaglandin endoperoxides
and thromboxanes in human platelets. New treatment
models emerging from prostaglandin research
Internation. Congress of Pharmacology, Helsinki 1975
- 96 Samuelsson B, Granström E, Green K, Hamberg M,
Hammarström S: Prostaglandins.
Ann.R.Bioch. 44: 669-695, 1975
- 97 Schmidt U, Dubach UC:
Induction of Na-K-ATPase in the proximal and distal
convolution of the rat nephron after uninephrectomy.
Pflügers Arch. 343: 39-48, 1974
- 98 Schneider WP, Pike JE, Kubiecki FP:
Determination of the origin of a Keto-15 OH-10,
13-prostadienoic acid by a double labeling technique.
Biochim.Biophys.Acta 125: 611-613, 1966
- 99 Srivastava KC, Clansen J:
Stability of prostaglandin E compounds in solution.
Lipids 8: 592-594, 1973
- 100 Siegel NJ, Kaufmann J, Hayslett JP:
Functional and hemodynamic adaptation to progressive
renal ablation (Abstract).
J.Clin.Invest. 53: 75a, 1974
- 101 Smigel M, Fleischer S:
Characterization and localization of prostaglandin E₁
receptors in rat liver plasma membranes.
Biochim.Biophys.Acta 332: 358-373, 1974

- 102 Smith JB, Willis AL:
Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets.
Nature (New Biol) 231: 235-237, 1971
- 103 Solez K, Fox JA, Miller M, Heptinstall RH:
Effects of indomethacin on renal innermedullary plasma flow. Prostaglandins 7: 91-98, 1974
- 104 Spector D, Zusman RM, Caldwell BV, Speroff L:
The distribution of prostaglandin A, E and F in the human kidney. Prostaglandins 6: 263-270, 1974
- 105 Splawinski JA, Nies AS, Sweetman B, Oates JA:
The effects of arachidonic acid, prostaglandin E_2 and prostaglandin $F_{2\alpha}$ on the longitudinal stomach strip on the rat.
J.Pharm.Exper.Therap.187: 501-509, 1973
- 106 Staszewska-Barczak J, Vane JR:
The role of prostaglandins in the local control of circulation. Clin.Exp.Pharm.Phys. 2: 71-78, 1975
- 107 Stein JH, Kirschenbaum MA, Bay WH, Osgood RW, Ferris TF:
Role of the collecting duct in the regulation of sodium balance. Circ.Res. Suppl.1 36,37: 119-124, 1975
- 108 Stone KJ, Hart M:
Prostaglandin E_2 -9-Ketoreductase in rabbit kidney. Prostaglandins 10: 273-288, 1975
- 109 Stylos W, Burstein S, Rivetz B, Gunsalus P, Skarnes R:
The production of anti-F prostaglandin serum and its use in radioimmunoassay.
Intra-Science Chem.Rept. 6: 67-71, 1972

- 110 Stylos W, Howard L, Ritzi E, Skarnes R:
The preparation and characterization of prostaglan-
din E₁ antiserum. Prostaglandins 6: 1-13, 1974
- 111 Svanborg K, Bygdeman M:
Metabolism of prostaglandin F_{2α} in the rabbit.
Eur.J.Biochem. 28: 127-135, 1972
- 112 Tannenbaum J, Splawinski JA, Oates JA, Nies AS:
Enhanced renal prostaglandin production in the dog:
I. Effects on renal function.
Circ.Res. 36: 197-203, 1975
- 113 Toback FG, Lowenstein LM:
Uridine metabolism during normal and compensatory
renal growth. Growth 38: 17-34, 1974
- 114 Toback FG, Smith PD, Lowenstein LM:
Phospholipid metabolism in the initiation of renal
compensatory growth after acute reduction of renal
mass. J.Clin.Invest. 54: 91-97, 1974
- 115 Vančura P, Malt RA:
Aerobic and anaerobic energy metabolism in compen-
satory renal hypertrophy.
Am.J.Physiol. 225: 281-286, 1973
- 116 Vane JR: Inhibition of prostaglandin synthesis as a
mechanism of action for aspirin-like drugs.
Nature (New Biol.) 231: 232-235, 1971
- 117 Vanherweghem JL, Ducobu J, Hollander AD:
Effects of Indomethacin on renal hemodynamics and
water and sodium excretion by the isolated dog kidney.
Pflügers Arch. 357: 243-252, 1975
- 118 Vonkeman H, van Dorp DA:
The action of prostaglandin synthetase on 2-arachidonyl-
lecithin. Biochim.Biophys.Acta 164: 430-432, 1968

- 119 Warren DJ, Ledingham JCG:
The effects of general anaesthesia on renal blood
flow in the rabbit (Abstr.)
Europ.Soc.Clin.Invest. 8 Ann.Meet.Rotterdam, 1974
- 120 Weber P, Holzgreve H, Stephan R, Herbst R:
Plasma renin activity and renal sodium and water
excretion following infusion of arachidonic acid
in rats. Europ.J.Pharmacol. 34: 299-304, 1975
- 121 Weber P, Larsson C, Änggård E, Hamberg M,
Samuelsson B, Corey E, Nicolaou K
Stimulation of renin release from rabbit renal
cortex by arachidonic acid and prostaglandin endo-
peroxides. Circ.Res. 1976, in press
- 122 Weeks JR, Schulz JR, Brown WE:
Evaluation of smooth muscle bioassays for prostag-
landins E_1 and $F_{1\alpha}$. J.Appl.Physiol. 25: 783, 1968
- 123 Weinman EJ, Renquist K, Stroup R, Kashgarian M,
Hayslett JP:
Increased tubular reabsorption of sodium in compen-
satory renal growth.
Am.J.Physiol. 224: 565-571, 1973
- 124 Weiss P: Self-regulation of organ growth by its own
products. Science 115: 487-488, 1952
- 125 Williams MW, Wilson TW, Oates JA, Nies AS,
Fröhlich JC:
Origin of urinary prostaglandins.
J.Clin.Invest. 53: 85, 1974
- 126 Zia P, Horton W: A chromatographic technique
(Sephadex LH-20) for the separation of major prostag-
landins. Prostaglandins 4: 543-551, 1973

- 127 Zins GR:
Renal prostaglandins. Am.J.Med. 58: 14-24, 1975
- 128 Zusman RM:
Quantitative conversion of PGA or PGE to PGB.
Prostaglandins 1: 167, 1972
- 129 Zusman RM, Caldwell BV, Speroff L:
Radioimmunoassay of the A prostaglandins.
Prostaglandins 2: 41-52, 1972

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der Nephrologischen Abteilung der II. Medizinischen Klinik, besonders Frau J. Grabmeier für ihre freundliche Unterstützung und Frau I. Zatzkowski für die sorgfältige Durchführung der Kaninchenexperimente.

Herrn Dr. B. Scherer und Frau Dr. C. Larsson möchte ich für ihr Interesse an der Arbeit und ihre anregenden Diskussionen herzlich danken.

Mein Dank gilt besonders Herrn Dr. P. Weber für die Überlassung des Themas, seine stetige Anteilnahme an der Arbeit und seinen anregenden Diskussionen.

Herrn Professor Dr. E. Buchborn und Herrn Professor Dr. J. Eigler danke ich für die vielseitigen Arbeitsmöglichkeiten innerhalb der nephrologischen Abteilung.

Herrn PD Dr. Ochsenfahrt aus dem Pharmakologischen Institut Tübingen (Direktor Professor Dr. M. Siess) danke ich für die nette Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

L e b e n s l a u f

Am 12.8.1951 wurde ich als Sohn des Arztes Dr. Manfred Siess und dessen Ehefrau, geb. Knauss, in Tübingen geboren. Dort besuchte ich die Volksschule bis 1959, anschließend die Volksschule und das Humanistische Gymnasium in Marburg (1961 - 1970).

Im Wintersemester 1970/71 begann ich das Medizinstudium in Marburg und legte dort 1973 das Physikum ab. Nach einem klinischen Semester in Heidelberg setzte ich 1974 mein Studium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München fort und arbeitete als Doktorand an der Nephrologischen Abteilung der II. Medizinischen Universitätsklinik. Im Dezember 1976 schloß ich mein Medizinstudium mit dem Staatsexamen an der TU München ab.

